N° d'ordre : 174

A.O. 7468

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR - INGÉNIEUR

PAR

Jean-Claude BOILOT

INGÉNIEUR-CHIMISTE E. N. S. C. B.

LICENCIÉ ÈS SCIENCES PHYSIQUES

Analyse conformationnelle de l'hormone hypothalamique TRF par résonance magnétique nucléaire et spectroscopie de vibration

---

Soutenue le 18 juillet 1972, devant la Commission d'Examen :

M. A. PACAULT Membre correspondant de l'Institut, Professeur . ***Président.***

M. B. LEMANCEAU, Professeur ..... } ***Examinateurs***

M. J. LASCOMBE, Professeur ..... }

M^lle^ A.M BELLOCQ, Docteur ès Sciences ..... }

— 1972 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547317_0024

N° d'ordre : 174

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR - INGÉNIEUR

PAR

Jean-Claude BOILOT

INGÉNIEUR-CHIMISTE E. N. S. C. B.

LICENCIÉ ÈS SCIENCES PHYSIQUES

Analyse conformationnelle de l'hormone hypothalamique TRF par résonance magnétique nucléaire et spectroscopie de vibration

Soutenue le 18 juillet 1972, devant la Commission d'Examen :

M. A. PACAULT Membre correspondant de l'Institut, Professeur . — *Président.*

M. B. LEMANCEAU, Professeur .....

M. J. LASCOMBE, Professeur ..... } *Examinateurs*

M^lle A.M BELLOCQ, Docteur ès Sciences .....

— 1972 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents,

A ma femme,

A mon fils.

Le présent travail a été effectué au Centre de Recherches Paul Pascal, dirigé par Monsieur PACAULT, Membre correspondant de l'Institut. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma sincère reconnaissance pour l'appui matériel dont il m'a fait bénéficier et pour l'honneur qu'il me fait de présider mon jury de thèse.

J'ai plus spécialement effectué cette étude sous la direction de Mademoiselle BELLOCQ, Chargée de Recherches au C.N.R.S. Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude pour les encouragements et conseils qu'elle m'a toujours prodigués au cours de ce travail et l'aide précieuse qu'elle m'a apportée.

Mademoiselle GARRIGOU-LAGRANGE, Maître de Recherches au C.N.R.S., m'a initié à la spectroscopie de vibration ; je lui adresse mes très sincères remerciements pour le soutien amical qu'elle m'a toujours accordé.

Je remercie Monsieur LEMANCEAU, Professeur à l'Université de Bordeaux I, pour m'avoir conseillé avec efficacité lors des études effectuées par résonance magnétique nucléaire.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur LASCOMBE, Professeur à l'Université de Bordeaux I, qui, dès le départ de ce sujet de recherches, s'est particulièrement intéressé aux problèmes qu'il posait.

Je remercie aussi très vivement le Docteur R.O. STUDER de la Société Hoffman-La Roche de Bâle, qui m'a fourni les composés que j'ai étudiés.

Tout au long de mes travaux de thèse, j'ai pu apprécier l'aide amicale et efficace de mes camarades du Centre de Recherches Paul Pascal, et plus spécialement celles de Messieurs CLIN, COMBELAS, GRENIE et VITORES.

Enfin, je tiens à adresser mes remerciements amicaux à Madame CAZAUX et Monsieur MOINEAU pour leur aimable collaboration à la réalisation technique de ce mémoire.

SOMMAIRE

PAGES

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

GENERALITES SUR LE FACTEUR HYPOTHALAMIQUE (TRF) DE LIBERATION DE LA THYREOSTIMULINE (TSH) . . . . . 3 à 12

DEUXIEME PARTIE

ETUDE CONFORMATIONNELLE DU TRF PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE . . 13 à 41

Chapitre I : Attribution du spectre RMN du TRF 17

Chapitre II : Analyse conformationnelle du TRF en solution 25

Résidu pyroglutamyle 25

Résidu prolyle 26

Résidu histidyle 29

Structure du squelette 38

Action des cations paramagnétiques 39

TROISIEME PARTIE

ETUDE CONFORMATIONNELLE DU TRF PAR SPECTROSCOPIE DE VIBRATION . . . . 43 à 76

Chapitre I : Interprétation du spectre infrarouge et étude conformationnelle du TRF à l'état solide 47

Spectres de vibration de l'acétyl-L-prolinamide (A Pro A) 49

Spectres de vibration du L-pyroglutamyl-méthylamide (PCA-MA) 55

Spectres de vibration de PCA-His-ME, PCA-His-DMA et PCA-His-Pro A 62

Chapitre II : Interprétation du spectre Raman et étude conformationnelle du TRF en solution aqueuse 69

Attribution du spectre Raman du TRF 69

Discussion 72

CONCLUSION 77

APPENDICE : Conditions expérimentales 83

BIBLIOGRAPHIE 85

INTRODUCTION

L'hormone hypothalamique TRF ("Thyréostimulin releasing factor") stimule la sécrétion par l'hypophyse de la thyréostimuline TSH ("Thyroïd stimulating hormone"), laquelle, à son tour, commande la sécrétion des hormones iodées par la thyroïde. Cette "releasing hormone" hypothalamique a été isolée récemment par GUILLEMIN (1) et SCHALLY (2). Sa structure moléculaire, établie par ces auteurs, est celle d'un tripeptide : le L-pyroglutamyl - L - histidyl - L - prolinamide (fig. 25) (3, 4).

Le TRF apparaît comme un facteur essentiel dans l'équilibre thyroïdien, et son isolement, outre les conséquences cliniques directes sur la pathologie thyroïdienne, présente un vaste intérêt car il est très vraisemblablement le plus simple des "releasing facteurs" hypothalamiques. La découverte de sa structure offre de nouvelles possibilités aux médecins et les études menées en particulier par SCHALLY et MILHAUD (3) devraient logiquement aboutir à l'utilisation thérapeutique du TRF dans l'insuffisance hypothalamique primitive (5, 6). Cependant, à l'heure actuelle, on ne dispose que de peu d'informations sur son mécanisme d'action et sur celui des "releasing hormones" hypothalamiques en général. Un élément important pour élucider ce problème serait la connaissance de la conformation de ces molécules ; en effet, dans de nombreux systèmes peptidiques, il existe une relation entre la structure et l'activité biologique.

La conformation d'un squelette peptidique, - $CONH-C_\alpha HR_1-C'ONH-$, peut être décrite sans ambiguïté lorsque les valeurs des angles de rotation ϕ_i et ψ_i autour des liaisons $N-C_\alpha$ (ϕ_i) et $C_\alpha - C'$ (ψ_i) sont connues. La géométrie du TRF est fonction de neuf paramètres de rotation : les six angles ϕ_i et ψ_i définis ci-dessus, les deux angles de rotation χ_1 et χ_2 autour des simples liaisons $C_\alpha - C_\beta$ et $C_\beta - C_\gamma$ de la chaîne latérale du résidu histidyle et l'angle de rotation ω autour de la liaison peptidique C' - N entre l'histidine et la proline ; on sait, en effet, que les liaisons formées avec les iminoacides peuvent exister sous deux configurations cis et trans. La rigidité des cycles pyrrolidone

et pyrrolidine impose une valeur déterminée aux angles dièdres ϕ_1 et ϕ_3 des résidus pyroglutamyle et prolyle ; ainsi, le nombre de variables est-il réduit à sept.

Nous avons abordé l'étude conformationnelle du TRF en solution aqueuse, milieu assez proche du milieu biologique, et à l'état solide par deux méthodes physicochimiques : la spectroscopie de vibration qui, on le sait, permet de mettre en évidence les liaisons hydrogène intra et intermoléculaires, et la résonance magnétique nucléaire qui est l'un des meilleurs moyens expérimentaux pour déterminer la géométrie moléculaire. Afin d'interpréter les spectres d'une grosse molécule telle que le TRF, il est indispensable de les analyser par comparaison avec ceux de composés homologues, appelés composés modèles.

Dans une première partie, nous essaierons de décrire assez simplement le système hypothalamo-hypophysaire , et plus précisément, les relations qui existent entre le TRF, la TSH et la thyroxine. Nous présenterons l'analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire dans une seconde partie, tandis que la troisième sera consacrée à l'interprétation des spectres de vibration.

Enfin, nous regrouperons nos résultats dans une dernière partie qui se présentera sous forme de conclusion.

- Première partie -

GENERALITES SUR LE FACTEUR HYPOTHALAMIQUE (TRF) DE LIBERATION DE LA THYREOSTIMULINE (TSH)

Deux grands systèmes de communication assurent la coordination des diverses fonctions qui s'exercent au sein des organismes pluricellulaires : le système nerveux et le système endocrinien. Le premier met en jeu les phénomènes d'excitabilité et les mécanismes de réponse, par le moyen de deux types d'éléments cellulaires spécialisés, les neurones ou cellules nerveuses, et les myones ou cellules musculaires. Le second règle l'ensemble des opérations liées à la production et à l'action des messagers chimiques appelés "hormones".

Le terme hormone, forgé en 1905, vient d'un mot grec signifiant "j'excite", "je mets en mouvement" ; actuellement, cette dénomination est réservée aux substances de nature organique, sécrétées par certaines glandes spécialisées qui les introduisent en doses infimes directement dans le sang. Ces glandes sont dites à sécrétion interne, ou endocrines (du grec "endon", en dedans et "krinein", sécréter), car elles n'utilisent pas de canal excréteur pour libérer leur sécrétion, mais la déversent directement dans le système circulatoire. Celui-ci véhicule alors les hormones jusqu'à l'organe pour lequel elles ont été produites, et qui est appelé à jouer le rôle d'"effecteur". Une fois utilisées, elles sont réduites à l'état de déchets et sont rapidement éliminées par le métabolisme intermédiaire.

Les glandes à sécrétion interne et leurs hormones contrôlent pratiquement toutes les fonctions vitales importantes: croissance, reproduction, nutrition, protection contre les maladies, adaptation aux différentes conditions. Bien que situées dans des parties distinctes de l'organisme, souvent éloignées les unes des autres, elles sont étroitement interdépendantes. Ces diverses glandes sont généralement elles-mêmes contrôlées par des hormones dites "stimulines" dont la production est régie par un centre qui se trouve dans le cerveau et qui s'appelle le cerveau endocrinien : c'est l'ensemble hypothalamo-hypophysaire, extraordinaire centrale neuro-chimique (fig. 1).

Primitivement appelée "glande pituitaire" (1543) par André VESALE, l'hypophyse est l'une des plus importantes glandes endocrines. Petit organe de la taille d'une noisette relié au cerveau par la tige pituitaire, l'hypophyse est constituée de deux parties distinctes : le lobe antérieur, ou antéhypophyse, ou encore adénohypophyse, qui présente la structure d'une glande à sécrétion interne ; et le lobe postérieur, ou posthypophyse ou encore neurohypophyse, qui est formé de fibres nerveuses. L'hypothalamus n'a été mis en évidence que

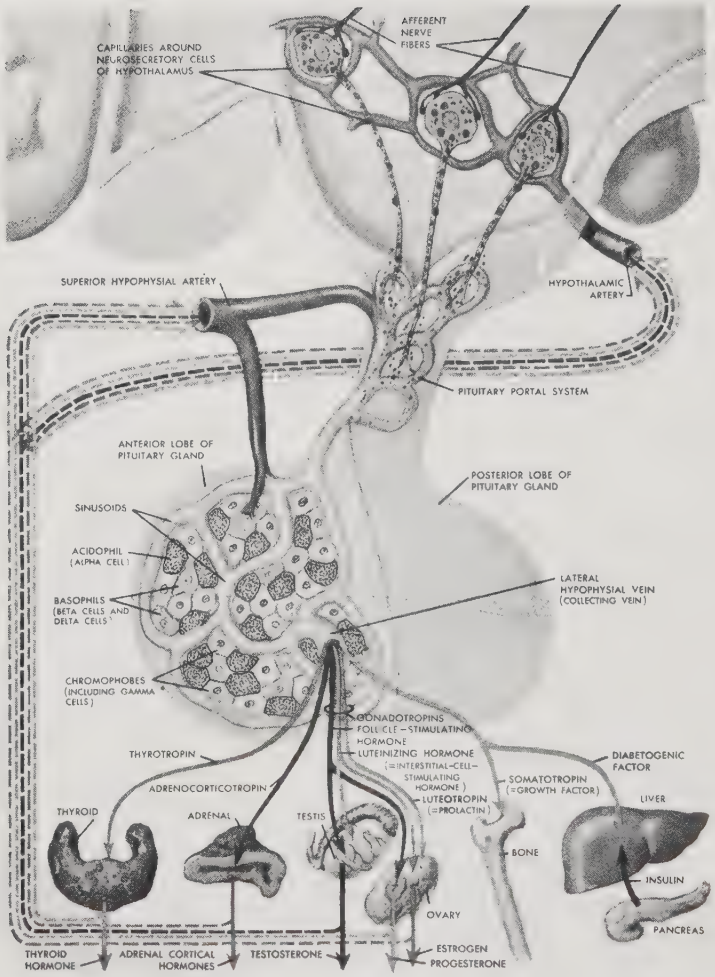


Figure 1 : Relations hypothalamo-hypophysaires.

beaucoup plus tard, grâce au rat Gaspard, qui s'est mis un beau jour à bouder les femelles ; le Professeur Alan E. FISHER, de l'Université de Pittsburg aux Etats-Unis, avait eu l'idée de lui injecter des hormones mâles dans une certaine région du cerveau et s'attendait à le voir manifester, à la suite de cette injection, une activité sexuelle débordante. Or, à la grande surprise de l'expérimentateur, ce fut le contraire qui advint. Gaspard, loin de se comporter en adolescent impétueux, se comporta en parfaite mère de famille, poussant le zèle jusqu'à édifier très soigneusement un nid dans sa cage. "La substance que j'ai inoculée n'a aucune importance, fut bien obligé de conclure le Professeur FISHER ; ce qui compte, c'est l'endroit où la seringue a porté...". Cet endroit, c'était l'hypothalamus, un territoire cérébral d'une telle exiguïté que son poids n'excède pas quatre grammes chez l'homme, et beaucoup moins chez Gaspard.

Jusqu'aux années 1950, on pensait que l'hypophyse et plus précisément l'antéhypophyse, était le chef d'orchestre de tous les contrôles hormonaux de l'organisme. Lorsqu'on découvrit que la sécrétion de l'hypophyse était dirigée par l'état d'activité des glandes qu'elle commande, selon un mécanisme rétroactif automatique, on crut que tout était dit. Or, en fait, ce système de "feedback" n'est pas direct. L'antéhypophyse n'est qu'un sous-chef, et la partition est dirigée à un niveau supérieur du cerveau : par l'hypothalamus. Mais, comme on ne voyait aucune connexion, tant par microscopie ordinaire, que par microscopie électronique, entre l'hypothalamus et l'antéhypophyse, celui-ci pouvait à juste titre conserver son rôle autonome.

Les choses en seraient donc restées là si l'on avait continué à admettre le vieux postulat que, d'une part, existait un système nerveux central transmettant des messages tout au long de ses fibres, et, d'autre part, un système endocrinien sécrétant des substances transportées par voie sanguine. En fait, il a fallu admettre, vers 1960, que les deux systèmes étaient liés et s'interpénétraient pour assurer l'équilibre psycho-somatique de l'organisme. On n'a pas tardé à découvrir entre l'hypothalamus et l'antéhypophyse des connexions qui n'étaient pas nerveuses mais vasculaires. Les commandes hormonales se sont donc trouvées déplacées au niveau de l'hypothalamus puisqu'il était désormais prouvé qu'il tenait l'antéhypophyse sous son joug.

Au sein de l'hypothalamus, on a mis en évidence des cellules nerveuses, groupées en noyaux sécréteurs anatomiquement et physiologiquement distincts ; ce sont ces cellules qui, sensibles à la teneur du sang en telle ou telle hormone, apprécient un état de manque ou de trop plein, et déclenchent alors, par l'intermédiaire de l'antéhypophyse, l'ordre de décharge de l'hormone nécessaire.

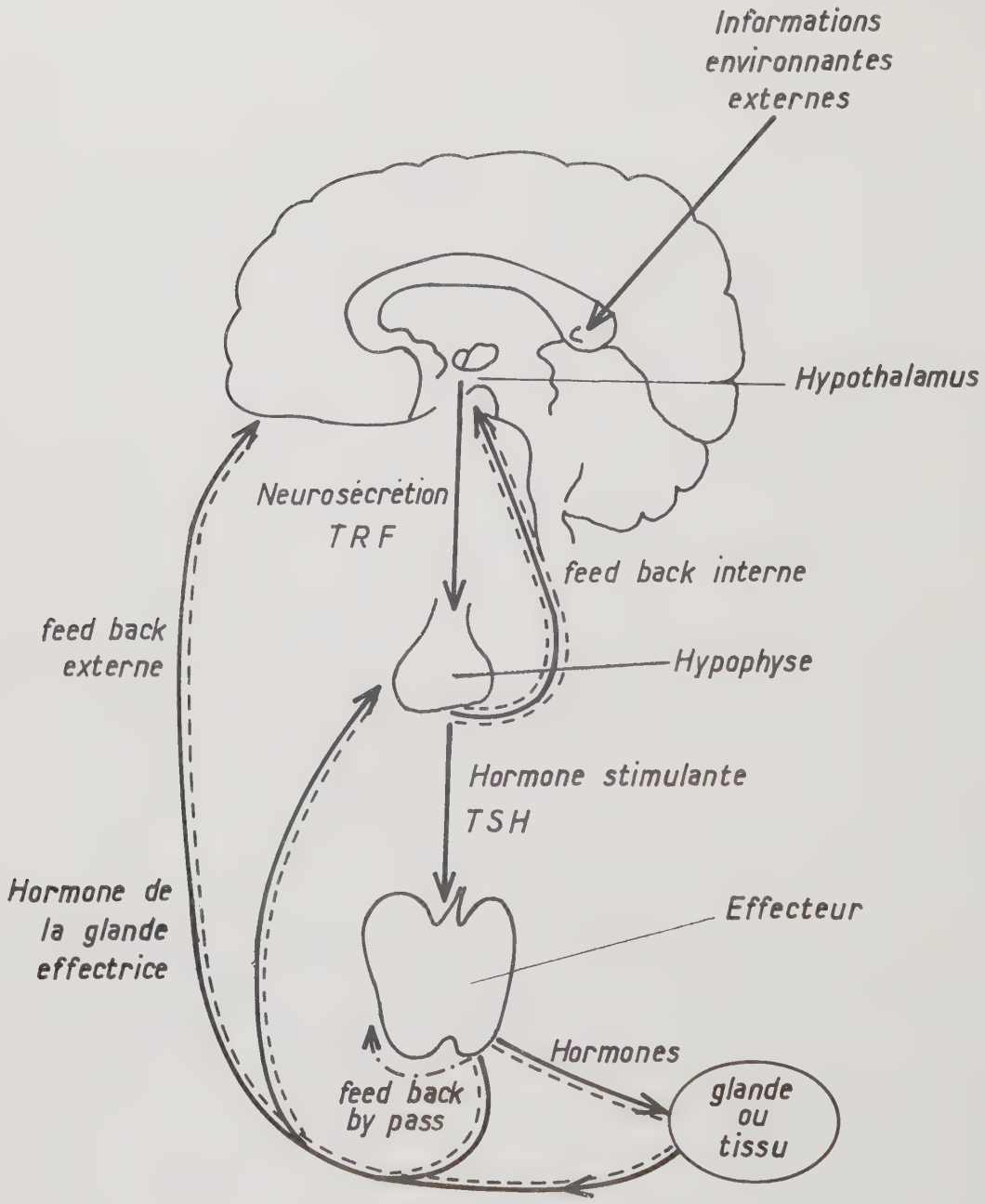


Figure 2 : Mécanisme d'auto-régulation du système hypothalamo-hypophysaire.

Les fibres nerveuses qui partent des noyaux hypothalamiques se terminent au niveau d'un système de vaisseaux sanguins, très dense, le système porte, qui vascularise l'antéhypophyse. On a pu mettre en évidence un transfert de substances entre les fibres nerveuses et les vaisseaux sanguins ; elles apparaissent sous forme de neuro-sécrétats, qui sont les hormones hypothalamiques appelées "releasing hormones". Ces médiateurs chimiques, arrivés au niveau des cellules réceptrices de l'antéhypophyse, engagent sélectivement la sécrétion d'une hormone pituitaire. Celle-ci, agissant sur le tissu ou la glande endocrine cible, provoquerait la sécrétion plus ou moins intense d'autres hormones. Ces dernières, transportées par la circulation générale, exercent un effet de frein à deux niveaux : soit à celui de l'amplificateur (l'hypophyse), soit à celui du générateur (l'hypothalamus). Il s'agit là du "feed-back" externe (fig. 2). Il existe également un "feed-back interne" entre l'hypophyse et l'hypothalamus. La stabilité, la vitesse de réponse ou l'inertie du système sont conditionnées suivant les besoins par l'équilibre entre chacun de ces "feed-back".

On pense que chaque hormone sécrétée par l'hypophyse, est activée par une "releasing hormone" hypothalamique (tableau I). Des sept hormones antéhypophysaires, quatre contrôlent l'activité d'autres glandes endocrines, d'où leur nom de stimulines ; la prolactine a un rôle double puisqu'elle agit à la fois sur un tissu et sur une glande ; enfin, les deux autres hormones pituitaires agissent directement sur les tissus effecteurs.

La "thyréostimuline releasing hormone" active l'hormone thyréotrope de l'antéhypophyse qui règle le taux de sécrétion par la thyroïde des hormones iodées et en particulier de la thyroxine. Le passage dans le sang de ces dernières règle en retour la sécrétion de TRF par l'hypothalamus. En l'absence de ces hormones se développe un syndrome connu comme le crétinisme, caractérisé par un retard intellectuel considérable ; en revanche, un excès de thyroxine provoque une hyperactivité générale.

MILHAUD (6) a étudié la cinétique de la variation des taux de TSH circulante après injection de TRF de synthèse à des enfants normaux, hypothyroïdiens et nains. L'intérêt de la découverte de la structure du TRF se dégage de son étude puisqu'il a montré que l'injection de TRF de synthèse constitue un test qui permet de reconnaître la localisation hypothalamique ou hypophysaire d'une hypothyroïdie consécutive à un défaut de TSH.

De nombreuses recherches furent faites au cours du dernier siècle pour tenter d'isoler, et reconstituer synthétiquement les hormones sécrétées par les glandes endocrines.

Releasing facteur hypothalamique*	Hormone hypophysaire	Glandes ou tissus effecteurs	Action
TRF	thyréostimuline (TSH)	thyroïde	sécrétion de thyroxine
CRF	corticostimuline (ACTH)	corticosurrénales	sécrétion de corticol et de progestérone
(LH/FSH)RF	lutéinostimuline (LH)	glandes génitales	sécrétion de progestérone ou d'androgènes
	folliculostimuline (FSH)		croissance du follicule ou formation de spermatozoïdes
PIF	prolactine (LTH)	corps jaune glandes mammaires	
GRF	somatotropine (GH ou STH)	os et muscles	synthèse de protéines
MRF	mélanotropine (MSH)	cellules pigmentaires	arrête les U.V.

Tableau I : Relations hypothalamus - hypophyse - organe cible

* Les deux termes : "releasing hormone" RH et "releasing facteur" RF sont utilisés concuremment dans la littérature.

Un effort particulier a porté sur la composition chimique des "releasing facteurs" hypothalamiques. Le TRF est vraisemblablement la plus simple de ces substances régulatrices, porteuses de messages codés qui descendent de l'hypothalamus jusqu'à l'antéhypophyse pour la stimuler. A partir de 500.000 hypothalamus de mouton, GUILLEMIN isola en 1965 (1) dans un état de grande pureté 250 µg de cette hormone. SCHALLY, en 1966, (2) réalisa la même expérience à partir d'hypothalamus de porc , et montra que trois acides aminés étaient présents dans la molécule de TRF : l'histidine, l'acide glutamique et la proline. Plus récemment, GUILLEMIN (3) indiquait que la structure de l'hormone naturelle d'origine ovine était celle d'un tripeptide : la pyroglutamyl - histidyl - prolylamide. Indépendamment, SCHALLY proposait la même structure pour le TRF d'origine porcine (4).

D'autres "releasing hormones" font actuellement l'objet de nombreuses recherches. Dans un article récent publié en 1971, SCHALLY suggère que les gonadostimulines sont activées par un même "releasing facteur", le LRF (7). Cette hormone est un décapeptide de faible poids moléculaire, constitué de 9 acides aminés différents et dont la séquence est : (pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2. Quelques mois après, SCHALLY (8) isole d'hypothalamus de porc un décapeptide de structure : Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala, qui présente une activité de "releasing hormone" de croissance.

Comme nous l'avons déjà signalé, on ne dispose à l'heure actuelle que de peu d'informations pour proposer un mécanisme d'action des "releasing facteurs" hypothalamiques (9). Certains auteurs pensent toutefois qu'ils agissent selon un mécanisme commun à de nombreuses hormones mettant en jeu un même agent régulateur intracellulaire : l'AMP cyclique.

L'activité biologique d'un peptide est due à l'interaction entre la molécule et son récepteur ; il est donc important de connaître sa structure spatiale avant et au moment de l'interaction. La difficulté de ce problème provient de la grande variété de facteurs qui peuvent l'influencer. Une des approches pour le résoudre est la comparaison de l'activité relative de l'hormone naturelle avec celle de plusieurs de ses analogues modifiés en des sites définis de la molécule ; ceci permet d'identifier les groupements chimiques impliqués dans la liaison avec le récepteur, le reste de la molécule n'étant qu'un support naturel qui permet de placer ces groupes chimiques dans des positions bien précises. Parmi les analogues capables de se fixer sur un même récepteur, certains ne déclenchent pourtant pas les réactions conduisant à la réponse biologique finale ; ce sont des inhibiteurs compétitifs de l'hormone naturelle, ce qui leur confère un grand intérêt tant pour le physiologiste que pour le pharmacologiste.

Jusqu'à présent, des modifications ont été apportées essentiellement aux résidus prolyle et histidyle (10 - 18). Les analogues, TRF - Pro NH CH_3 et TRF - Pro OCH_3 conservent environ 2 % de l'activité TRF (12). Les analogues dans lesquels la partie Pro NH_2 est remplacée par Val NH_2 ou Leu NH_2, considérés comme ayant un "cycle proline ouvert", sont inactifs (13), ce qui montre l'importance du résidu prolyle dans l'activité TRF. Il influence vraisemblablement la conformation de l'ensemble de la molécule, puisque, le plus souvent, il restreint l'espace conformationnel du résidu qui le précède.

HOFFMAN et BOWERS (14)rapportent que l'analogue du TRF dans lequel le noyau imidazole est substitué par le noyau pyrazole a encore environ 5 % de l'activité du TRH ; ils concluent que les propriétés acide - base du cycle imidazolique ne sont pas essentielles pour cette activité. Ce résultat semble être confirmé par les expériences de FOLKERS (15), car le remplacement de His par Phe conduit à un analogue qui présente 10 % de l'activité. La libération de la TSH par ce dernier composé fait ressortir l'importance du caractère aromatique de la chaîne latérale de l'histidine, mais les synthèses des dérivés $N^{3\ Im}$ Me - TRF et $N^{1\ Im}$ Me - TRF réalisées par BURGUS et coll (16) peuvent suggérer que la basicité de His n'est pas sans importance. L'activité du $N^{3\ Im}$ Me-TRF, 15 fois plus forte que celle du TRF, peut provenir d'une augmentation de la densité électronique sur l'azote en position 1 du noyau imidazolique à cause d'un effet inductif positif du groupe 3 - Méthyle, tandis que l'inactivité du $N^{1\ Im}$ Me - TRF peut résulter d'un encombrement stérique défavorable.

GUILLEMIN et SCHALLY ont montré que le TRF est inhibé par la triodothyronine (test T_3) et inactivé par incubation dans le sérum (19, 20). Afin de caractériser l'activité biologique des analogues, leur comportement vis-à-vis de ces réactifs a été examiné. Tous les composés cités ci-dessus sont inhibés lors du test T_3, par contre, seuls les plus actifs réagissent en présence de sérum de la même façon que le TRF.

Il faut cependant remarquer que ces études, si elles prouvent que les résidus histidyle et prolyle sont essentiels dans l'activité TRF, ne permettent pas de savoir si l'inactivation est due à la disparition d'un groupe chimique impliqué dans la liaison avec le récepteur, ou à une fixation préférentielle sur un inhibiteur.

Les méthodes physicochimiques constituent une autre approche de la structure géométrique des dérivés peptidiques en solution. Les deux parties suivantes de ce mémoire présentent les résultats que nous avons obtenus par résonance magnétique nucléaire et spectroscopie de vibration.

- Deuxième partie -

ETUDE CONFORMATIONNELLE DU TRF

PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Les conformations de nombreux dérivés peptidiques doués d'activité biologique ont été analysées ces dernières années à l'aide de la résonance magnétique nucléaire haute résolution. Parmi ces travaux, nous citerons ceux de BOVEY, ROBERTS et LIQUORI relatifs à l'oxytocine (21), la lysine-vasopressine (21, 22) et la gramicidine (23). Les polyprolines I et II ont également été étudiées (24, 25). La plupart de ces composés ont été examinés en solution dans le diméthyl sulfoxyde d_6 ou le chloroforme deutérié.

Pour déterminer la conformation la plus stable de l'hormone hypothalamique de libération de la thyréostimuline, nous avons exploité la technique RMN qui présente l'avantage de pouvoir utiliser l'eau comme solvant. L'étude conformationnelle d'une molécule physiologiquement active est d'autant plus intéressante qu'elle est faite dans un milieu proche du milieu vivant . De plus, le fait d'utiliser D_2O au lieu de H_2O simplifie l'attribution des spectres puisque la substitution de l'hydrogène par le deutérium supprime les couplages NH - C_α H.

Les spectres ont été obtenus avec un spectromètre Varian HA 100. Les valeurs indiquées par la suite sont exprimées en ppm, le TMS étant pris comme référence externe. Au cours des manipulations à température élevée, nous avons utilisé une référence interne : le triméthylsilane phénylsulfonate de sodium. Aucune correction de susceptibilité magnétique sur les déplacements chimiques n'a été faite, sauf lors de la comparaison des spectres du TRF en solution dans l'eau lourde et dans la pyridine d_5.

Dans un premier chapitre, nous présenterons l'interprétation des spectres RMN du "releasing facteur" TRF en solution aqueuse et pyridinique. Le deuxième chapitre sera consacré à l'analyse conformationnelle du TRF dans ces solvants. A partir des constantes de couplage des protons vicinaux J_{NH-CH}, nous essaierons de déduire l'angle dièdre ϕ du fragment NH - C_α H à l'aide d'une relation de KARPLUS modifiée, du type de celle proposée par BYSTROV (26).

- Chapitre I -

ATTRIBUTION DU SPECTRE RMN DU TRF

L'attribution du spectre de résonance magnétique nucléaire du TRF en solution aqueuse (tableau II) a été faite par comparaison avec les spectres des acides α aminés constituant la molécule, et avec ceux de composés modèles tels que le L-pyroglutamyl-méthylamide, l'acétyl-L-histidine, l'acétyl-L-prolinamide, le L-pyroglutamyl-L-histidyl-méthyl ester, et le L-pyroglutamyl-L-histidyl-diméthylamide (figures 3 à 8). Les formules et abréviations de ces composés sont regroupées figure 24 . D'autre part, l'intégration des spectres et le découplage des spins ont souvent donné des résultats suffisamment nets pour que l'on puisse en tirer parti de façon certaine.

D'une manière générale, tous les spectres RMN ont une allure assez semblable ; les protons des groupes méthyle et méthylène résonnent à champ plus fort que ceux des groupements CH tertiaires. Les protons imidazoliques sont observés vers les champs faibles dans la région des CH aromatiques. Les découplages spin-spin permettent d'identifier les protons vicinaux $CH-CH_2$ ou CH_2-CH_2 et de les attribuer à chaque résidu.

Les spectres RMN de l'histidine et de la proline (27), ainsi que celui de l'acide pyroglutamique (28) sont bien connus et ont été étudiés à différents pH.

Le spectre de l'acide L-pyroglutamique* en solution dans D_2O à pD = 1,5 (28) est constitué par trois massifs complexes, l'un vers 4,91 ppm attribué au proton porté par le carbone α, les deux autres vers 2,92 et 2,67 ppm, dans un rapport d'intensité 3 : 1, attribués aux quatre protons des groupements méthylènes en β et γ ; l'écart entre ces deux massifs croît avec le pH. VITORES (28) a montré que la complexité du spectre provenait de couplages

---

* aussi appelé "5 - oxo - proline" ou "2 pyrrolidone carboxylic acid" (PCA).

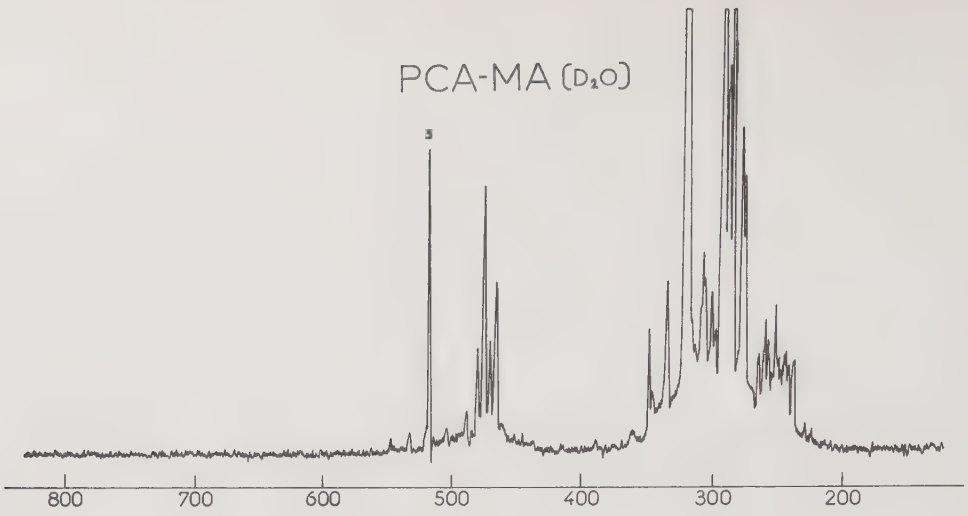


Figure 3 : Spectre RMN de PCA-MA en solution dans D_2O (pD = 4,5).

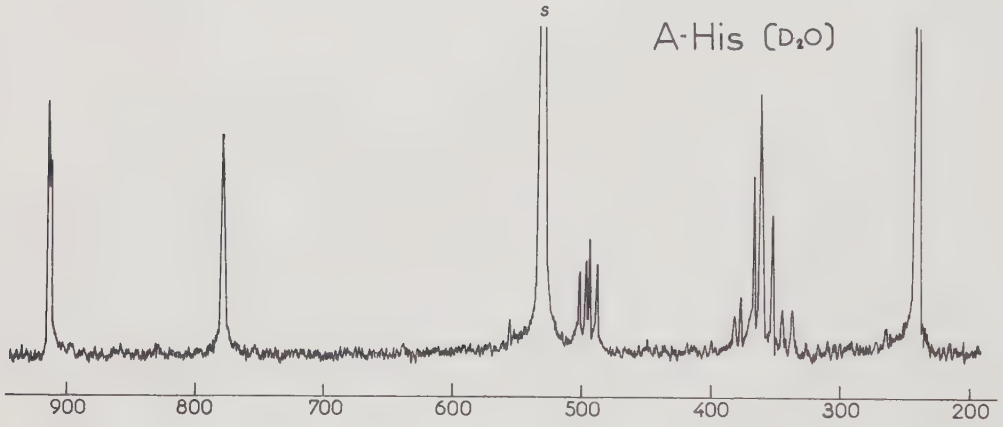


Figure 4 : Spectre RMN de A-His en solution dans D_2O (pD = 6).

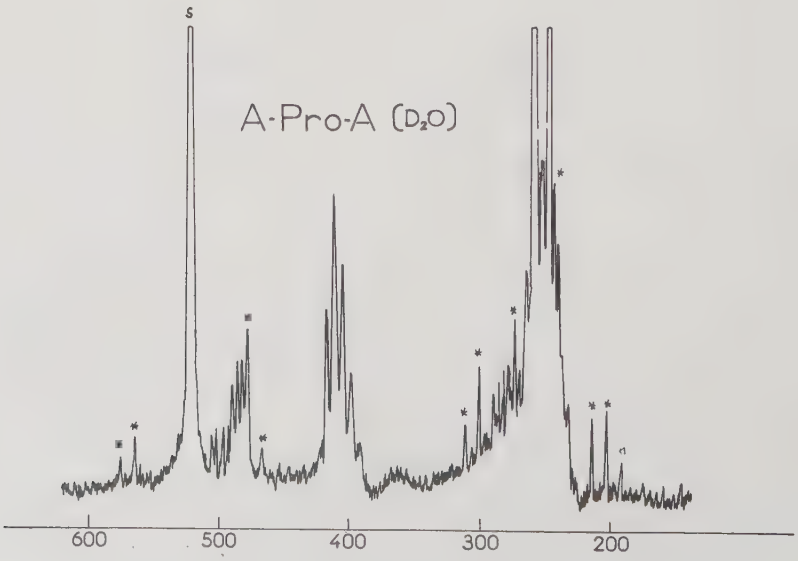


Figure 5 : Spectre RMN de A Pro A en solution dans D_2O (pD = 5).

à longue distance entre les différents protons.

Le spectre de l'acétyl-L-histidine en solution dans D_2O à pD = 6 (fig. 4) est facilement interprété ; les deux protons portés par les carbones imidazoliques résonnent vers les champs faibles à 9,12 et 7,78 ppm ; ceux des groupements CH(α) et CH_2(β) sont localisés respectivement vers 4,94 et 3,61 ppm ; quant aux protons du groupement acétyle, ils apparaissent comme un singulet à 2,40 ppm.

Si nous faisons abstraction du pic dû au groupe méthyle, tous ces massifs se retrouvent facilement sur les spectres des dipeptides PCA-His-Me et PCA-His-DMA dans D_2O (fig. 6, 7). Le spectre RMN du releasing facteur hypothalamique TRF en solution aqueuse (fig. 8) présente également tous ces massifs; les pics supplémentaires observés proviennent évidemment du résidu prolyle.

Comme nous l'avons signalé un peu plus haut, les quatre protons méthylènes (β β' γ γ') de l'acide pyroglutamique ne résonnent pas exactement à la même fréquence : l'un des protons (β) résonne à champ légèrement plus fort. Sur les spectres de tous les composés étudiés contenant le résidu pyroglutamyle (PCA-MA, PCA-His-ME, PCA-His-DMA), cette distinction apparaît plus nettement que sur celui de l'acide aminé lui-même. Il en est vraisemblablement de même sur le spectre du TRF. D'autre part, le spectre de la L-proline montre que l'un des quatre protons des groupements méthylènes β et γ résonne à champ légèrement plus faible que les trois autres (2,79 et 2,48 ppm) ; cette séparation est également visible sur les spectres des composés A Pro A (fig. 5), A Pro MA et His-Pro A (29). L'intégration faite sur les deux massifs à 2,81 et 2,38 ppm du TRF en solution aqueuse à pD = 9 indique qu'ils correspondent à quatre protons chacun ; nous attribuons le massif situé à champ plus élevé aux protons β'γ γ' du résidu prolyle et β du résidu pyroglutamyle, l'autre massif étant attribué aux protons β Pro et β' γ γ' PCA.

Par intégration, nous avons mis en évidence que le massif du TRF centré à 4,77 ppm correspond à deux protons, alors que ceux relevés à 4,20 et 3,97 ppm ne correspondent qu'à un proton chacun. Nous attribuons ces deux derniers massifs aux protons du groupement méthylène en position δ de la proline, et nous en déduisons que le massif correspondant au proton α du résidu prolyle se superpose à celui du proton α du résidu pyroglutamyle. Cette attribution est en accord avec celles de la L-proline et de l'acétyl-L-prolinamide en solution dans D_2O (fig. 5).

Les découplages spin-spin vérifient l'ensemble de cette interprétation ; en particulier, l'irradiation des protons γ Pro résonnant à 2,38 ppm transforme les deux multiplets attribués aux protons CH_2(δ) du résidu prolyle

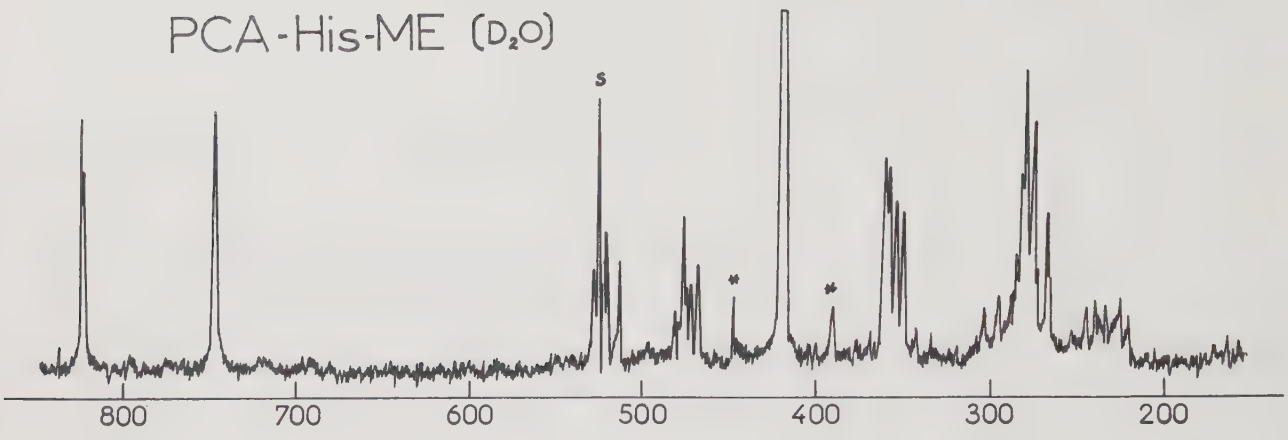


Figure 6 : Spectre RMN de PCA-His-ME en solution dans D_2O (pD = 7).

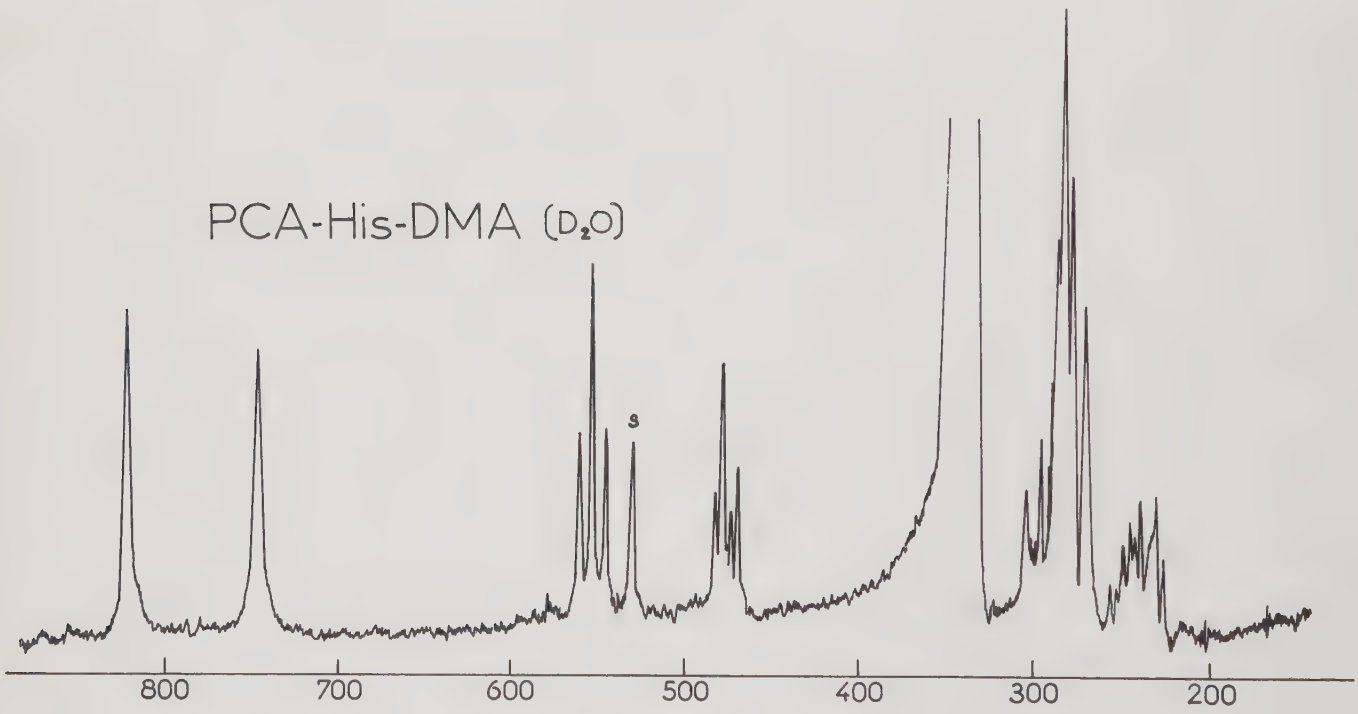


Figure 7 : Spectre RMN de PCA-His-DMA en solution dans D_2O (pD = 11).

en deux doublets et modifie légèrement les massifs à 4,77 et 2,81 ppm. La perturbation de ce dernier massif prouve que les deux protons CH_2 β de la proline ne résonnent pas à la même fréquence. Ce résultat est confirmé par le découplage des protons observés à 2,81 ppm qui provoque à son tour un léger changement des massifs à 2,38 et 4,77 ppm.

Par élévation de température jusqu'à 70° C, le pic dû au proton HOD se déplace vers les champs forts, ce qui permet d'observer un triplet à 5,35 ppm. La transformation de cette structure en un singulet, par irradiation des protons résonnant à 3,50 ppm, démontre que ces massifs proviennent d'un même résidu et vérifie l'attribution précédemment effectuée à l'aide des méthodes comparatives.

Nous avons également interprété le spectre RMN du TRF en solution dans la pyridine deutériée d_5 (fig. 9). Dans ce solvant, l'échange des protons portés par les atomes d'azote avec le deutérium ne peut pas se faire, contrairement à ce qui se passe en solution dans D_2O. La comparaison de ce spectre avec celui du dipeptide PCA - His - DMA en solution pyridinique permet d'attribuer facilement le massif à 4,62 ppm au proton CH(α) Pro et les deux pics distants de 136 cps à 7,84 et 9,20 ppm aux deux protons du groupement amide primaire. Plusieurs travaux montrent que ces protons donnent lieu à deux pics séparés, le proton cis par rapport au groupement carbonyle apparaissant à champ plus fort que le proton trans (30, 31). L'écart important que nous observons ne peut pas être interprété uniquement par cette isomérie cis-trans, mais doit résulter d'interactions spécifiques. Il est vraisemblable que les deux protons NH_2 sont liés différemment, l'un avec le solvant, l'autre participant à une liaison hydrogène intramoléculaire. Un écart d'environ 100 cps est également relevé sur les spectres de l'oxytocine entre les protons amides des résidus asparagine et glutamine (32). Les auteurs pensent que cet écart résulte de propriétés conformationnelles propres à la molécule d'oxytocine. Le calcul conformationnel du TRF indique que les structures, dans lesquelles un des protons du groupement NH_2 est lié par liaison hydrogène à l'atome d'oxygène du carbonyle du résidu histidyle, correspondent à des formes stabilisées (33).

Le découplage effectué sur le massif centré à 5,02 ppm modifie celui situé vers 3,05 ppm et transforme le doublet (8,97 et 9,05 ppm) en un singulet (9,01 ppm). Ces trois massifs correspondent donc à un même résidu, le résidu histidyle. Le spectre RMN de l'acide pyroglutamique en solution dans la pyridine d_5 montre les signaux de résonance suivants: 8,92, 4,25 et 2,74 ppm attribués respectivement aux protons NH, CH(α) et CH_2(β et γ). Sur le spectre du TRF nous retrouvons ces massifs à 8,97, 4,28 et 2,04 ppm. Les pics NH ont dans ces deux composés des positions proches, ce qui suggère que, comme dans l'acide

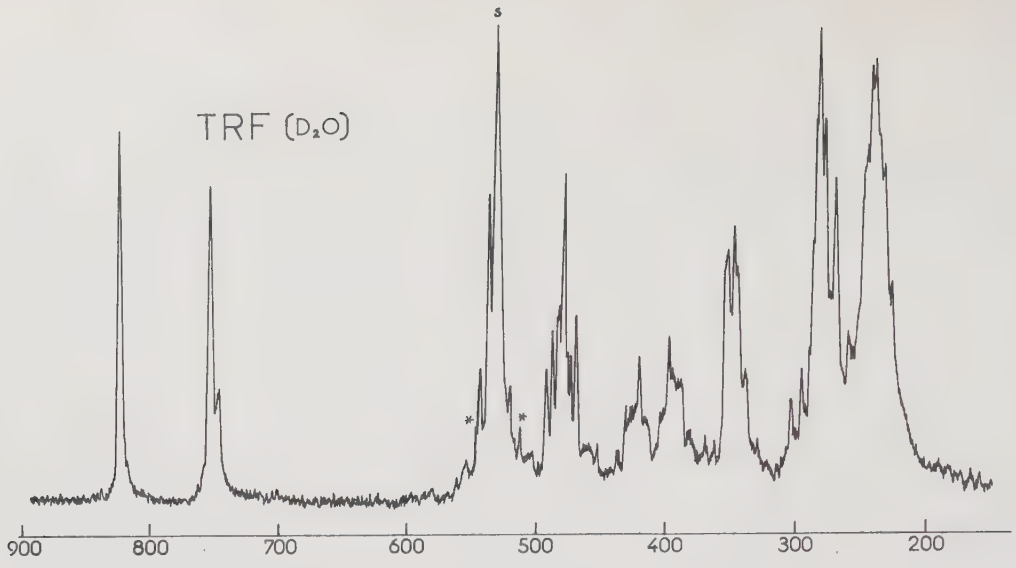


Figure 8 : Spectre RMN du TRF en solution dans D_2O (pD = 9).

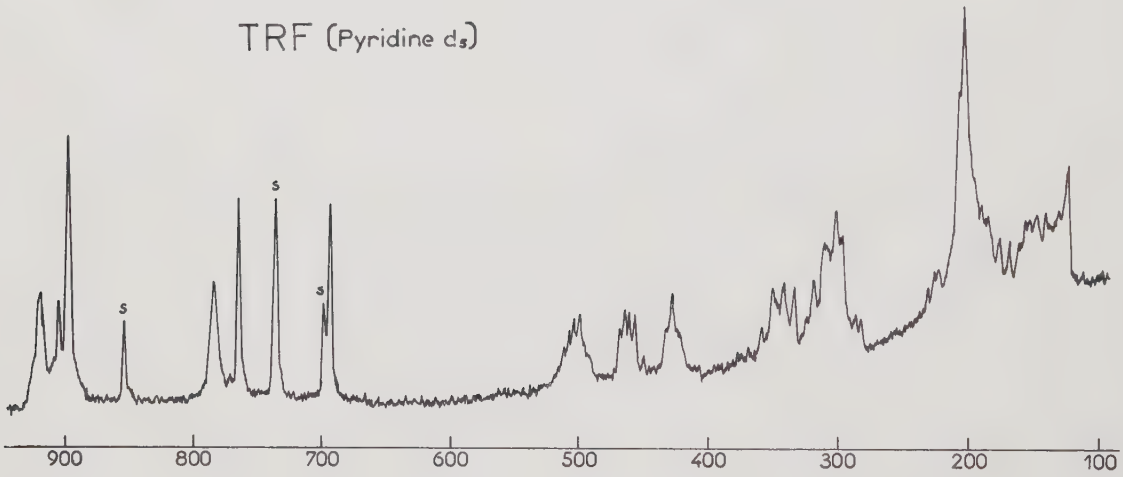


Figure 9 : Spectre RMN du TRF en solution dans la pyridine d_5.

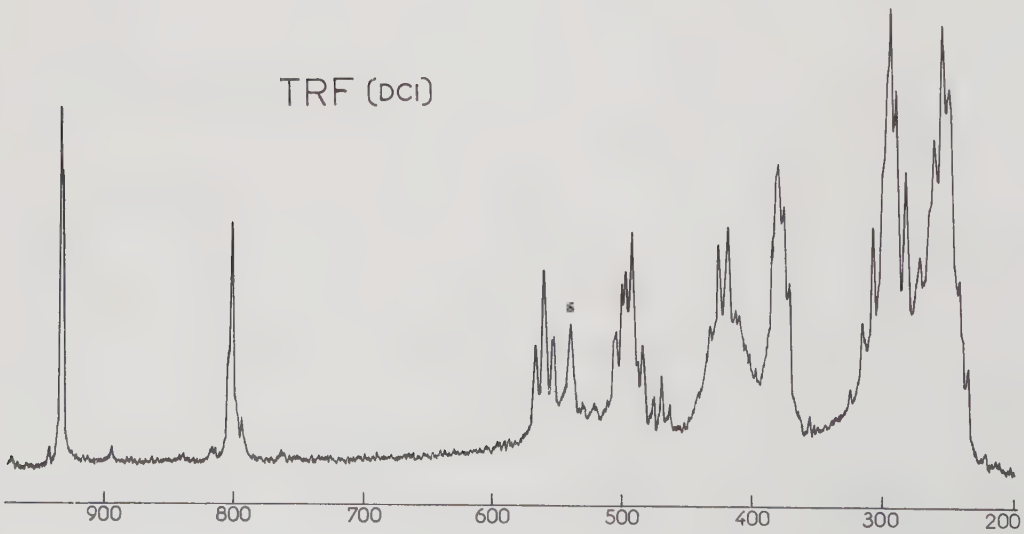


Figure 10 : Spectre RMN du TRF en solution dans D_2O (pD = 1).

Composés	ph	CH(2) Im	CH(4) Im	CH(α) His	CH(α) Pro	CH(α) PCA	CH_2(δ) Pro	CH_2(β) His	CH_2(γ) PCA	CH_2(β) PCA	CH_2(β) Pro	CH_2(γ) Pro
PCA - MA	4,5	-	-	-	-	4,75(q)	-	-	2,87(m)	2,87(m)-2,52(m)	-	-
A his	6	9,12(d)	7,78(s)	4,94(q)	-	-	-	3,61(m)	-	-	-	-
AProA(trans)	5	-	-	-	4,84(q)	-	4,10(t)	-	-	-	2,85(m)-2,50(m)	2,50(m)
AProA (cis)	5	-	-	-	4,99(q)	-	3,97(t)	-	-	-	2,85(m)-2,50(m)	2,50(m)
PCA-His-ME	7	8,25(d)	7,47(s)	5,20(q)	-	4,76(m)	-	3,55(m)	2,79(m)	2,79(m)-2,35(m)	-	-
PCA-His-DMA	11	8,21(s)	7,45(s)	5,52(t)	-	4,77(m)	-	3,40(m)	2,81(m)	2,81(m)-2,38(m)	-	-
TRF	9	8,23(d)	7,53(s)	5,35(t)	4,77(m)	4,77(m)	4,20(m)-3,97(m)	3,50(m)	2,81(m)	2,81(m)-2,38(m)	2,81(m)-2,38(m)	2,38(m)

TABLEAU II : Valeurs des déplacements chimiques en ppm (référence externe : TMS)
Concentration : 0,4 M/l dans D_2O.
s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet ; m : multiplet.

α aminé, le groupement NH du cycle pyrrolidone est associé par liaison hydrogène au solvant (28). Enfin, nous attribuons les deux pics restant vers les champs forts à 7,64 et 6,92 ppm aux deux protons C 2H et C 4H imidazoliques. L'étude faite en solution mixte pyridine d_5 - D_2O montre que le signal de résonance des deux protons $CH_2(\delta)$ apparaît toujours sous la forme de deux massifs distincts, dont l'un est partiellement caché en solution pyridinique par le massif dû aux protons $CH_2(\beta)$ du résidu histidyle. Quant au large massif situé en-dessous de 2,5 ppm, nous l'attribuons aux huit protons $CH_2(\beta$ et $\gamma)$ des résidus pyroglutamyle et prolyle.

Cette attribution est semblable à celle proposée par FLOURET (34) à l'exception cependant de celle des pics relevés vers les champs forts. Bien que nous n'ayons pas effectué une analyse détaillée du spectre entre 3,5 et 1,5 ppm, nous ne sommes pas d'accord avec FLOURET ; cet auteur place, en effet, l'un des protons β de la proline à 3,35 ppm. Comme nous l'avons vu précédemment,en solution aqueuse, les signaux de résonance des huit protons β et γ des résidus prolyle et pyroglutamyle se superposent en deux massifs peu éloignés l'un de l'autre. Par addition progressive d'eau dans la solution de pyridine, ces massifs se déplacent très nettement et tendent à prendre les positions adoptées dans la solution aqueuse. Comme aucun déplacement vers les champs forts des massifs situés entre 3,5 et 3,0 ppm n'est observé, nous concluons que les protons β et γ du résidu prolyle du TRF en solution pyridinique résonnent à des fréquences inférieures à 2 ppm.

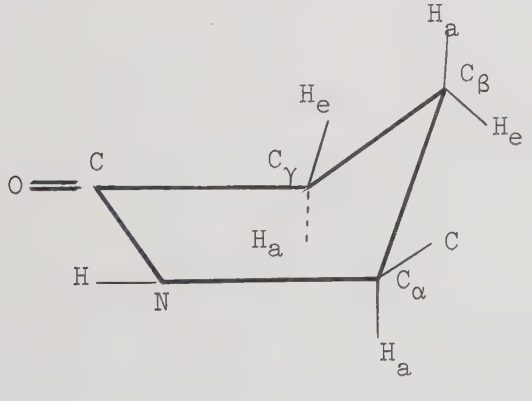
- Chapitre II -

ANALYSE CONFORMATIONNELLE DU TRF EN SOLUTION

A partir de tous les spectres RMN que nous avons examinés, nous allons tenter de dégager quelques informations conformationnelles concernant le TRF. Pour ce faire, nous étudierons chaque résidu pris isolément ; puis nous essaierons, grâce aux valeurs de certaines constantes de couplage particulières, de décrire l'orientation de ces résidus les uns par rapport aux autres.

1 - Résidu pyroglutamyle

Sur les spectres de l'acide pyroglutamique (28), le massif correspondant aux deux groupements méthylènes β et γ se présente toujours sous forme de deux multiplets d'intensités différentes, plus ou moins éloignés l'un de l'autre suivant le pH. L'intégration donne un rapport 3 : 1 en faveur de la partie qui se trouve vers les champs faibles. VITORES montre que le proton le plus déblindé est le proton β en position axiale et que le cycle pyrrolidone adopte la conformation indiquée ci-dessous, où le proton H - α est en position axiale. Il n'est pas étonnant que l'équilibre entre les différentes formes que peuvent adopter les cycles à cinq chaînons n'existe pas si la fonction amide cis CO-NH intracyclique rigidifie l'ensemble de la molécule.

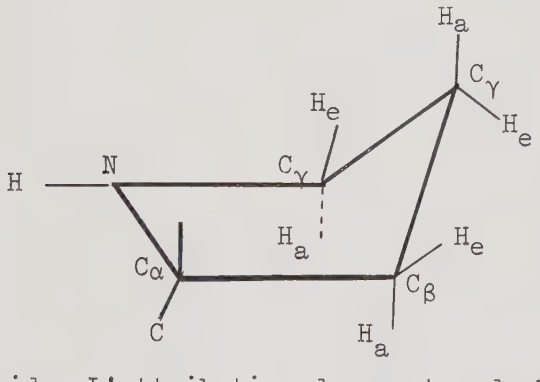


La demi-largeur du massif correspondant au proton CH(α) de PCA-MA est légèrement plus faible que celle de l'acide α aminé. Cette diminution s'observe également sur tous les spectres de l'acide pyroglutamique, et en particulier, sur celui du TRF. Les calculs effectués par VITORES permettent de relier ce rétrécissement à une moins grande déformation du cycle (28). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par cristallographie : la déviation de l'atome de carbone β par rapport au plan moyen défini par C_α, C_γ, C', N est de 0,40 Å dans la molécule d'acide pyroglutamique et seulement de 0,15 Å dans le méthylamide de cet acide (35, 36).

Nous constatons que sur les spectres des composés contenant le résidu pyroglutamyle, l'apport des noyaux imidazole et pyrrolidine ne perturbe pratiquement pas l'allure des massifs dûs aux protons du cycle pyrrolidone, ce qui suggère que dans l'hormone hypothalamique ce cycle est rigide et qu'il n'est qu'en faible interaction avec les autres résidus.

2 - Résidu prolyle

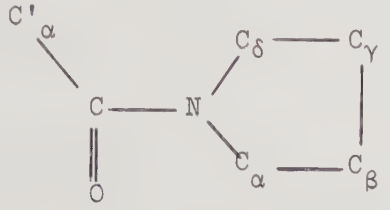
De nombreux travaux cristallographiques montrent que, dans les molécules de proline et de ses dérivés, le cycle pyrrolidine adopte une forme enveloppe dans laquelle l'atome de carbone γ est hors du plan formé par les quatre autres atomes. Sur les spectres RMN de Pro, A Pro A et A Pro MA en solution aqueuse, le proton CH(α) se présente sous la forme d'un quadruplet ; ceci signifie que les couplages à longue distance existant entre les protons de PCA disparaissent ou du moins diminuent fortement dans le noyau pyrrolidine. D'autre part, le fait d'avoir un quadruplet indique que les deux protons β ne sont pas magnétiquement équivalents ; c'est d'ailleurs ce que l'on attend puisque ces deux protons sont l'un en position axiale, l'autre en position équatoriale. L'inégalité des deux constantes de couplage $J_{\alpha\beta}$ et $J_{\alpha\beta'}$ (4 et 8 Hz) indique que le cycle pyrrolidine, comme le cycle pyrrolidone, n'existe que sous une seule forme conformationnelle, dans laquelle le proton H - α est en position axiale.



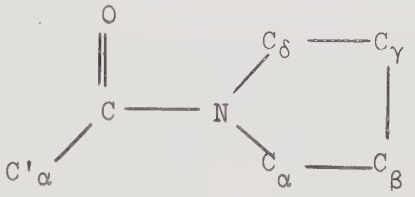
Sur le spectre du TRF, bien que la résonance du proton CH(α) Pro se superpose à celle du proton CH(α) PCA, il semble que la structure quadruplet subsiste et qu'en conséquence, le cycle pyrrolidine du "releasing facteur" soit rigide. L'attribution du spectre du TRF nous a conduit à distinguer les deux protons δ de ce cycle. L'écart de 23 cps entre les deux massifs pourrait provenir d'une différence d'environnement des deux protons résultant de la proximité de l'un d'eux avec le carbonyle du résidu pyroglutamyle ou de la déformation du cycle. Signalons qu'une différence de déplacement chimique égale à 23 Hz existe entre deux protons en position axiale et équatoriale du cyclohexane à - 58° C (37).

Isomérie cis-trans

La liaison peptidique entre deux acides α aminés adopte le plus souvent la configuration trans ; toutefois, lorsqu'elle est formée avec un résidu imino-acide, tel que le résidu prolyle, elle peut exister sous deux formes cis ou trans. La définition de ces deux configurations schématisées ci-dessous repose sur la disposition des deux atomes de carbone α (C_α, C'_α) par rapport à la liaison C'N.



trans



cis

Quand l'isomérie se produit, c'est-à-dire quand il y a rotation de 180° autour de la liaison C' - N, les protons α et δ échangent leurs positions par rapport au groupement carbonyle. Comme les deux formes s'échangent très lentement sur l'échelle des temps de la RMN, le spectre montre deux résonances séparées pour chaque type de proton. Cette isomérie des dérivés de la proline a été très étudiée par SCHELLMAN (38) et BLOUT (24). Le pourcentage de forme cis présente dans les solutions de A Pro, A Pro A et Gly - Pro dans le chloroforme deutérié ou le diméthyl sulfoxide d_6 a été évalué à 20 ou 30 % dans tous les cas. Nous avons voulu savoir si un tel équilibre existait dans la solution aqueuse de TRF, ou sinon, quelle était la forme prédominante. Pour cela, nous avons examiné l'acétyl-prolinamide dans D_2O. Le dédoublement des massifs des protons α et δ de ce dernier composé prouve que les deux espèces cis et trans sont présentes dans l'eau. Afin de préciser les proportions relatives de ces deux espèces, il est nécessaire d'attribuer les pics correspondant à chacune d'elles. On pourrait raisonner en considérant l'environnement du proton CH(α) par exemple, et sa position relative par rapport au groupement carbonyle ; en fait, BLOUT (24) a montré que ce problème est plus complexe car la position du massif dû au proton H_α est très sensible aux effets de solvant (tableau III) : il observe une prépondérance de la forme trans du dipeptide Gly - Pro aussi bien dans le chloroforme que dans le diméthylsulfoxyde. En solution chloroformique, le proton H_α de la forme trans résonne à champ plus faible que celui de la forme cis, alors que dans le solvant le plus polaire, cette attribution est inversée. L'examen

Composé \ Solvant	$CD Cl_3$		DMSO d_6		D_2O	
	C	T	C	T	C	T
Gly - Pro	4,56	4,71	4,69	4,50		
A Pro A	4,51	4,80			4,99*	4,84*

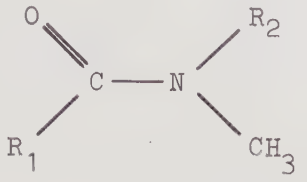
TABLEAU III : Déplacements chimiques (en ppm) correspondant au CH(α) des dérivés de la proline existant sous les deux formes cis et trans.

* Nos résultats.

de A Pro A en solution dans $CDCl_3$ et D_2O conduit à des résultats semblables. Ainsi, sur le spectre de A Pro A dans le milieu le plus polaire, le massif centré à 4,84 ppm est dû au proton CH(α) de la forme trans, et celui à 4,99 ppm à celui de la forme cis, les intensités étant dans un rapport 3 : 1.

Le proton porté par le carbone α du résidu prolyle est observé à 4,86 ppm sur le spectre RMN du TRF en solution aqueuse. Le fait que ce massif soit unique indique que la liaison peptidique formée entre les résidus His et Pro n'existe que sous une seule configuration. Par comparaison avec A Pro A, nous pensons qu'il s'agit de la forme trans. L'étude de l'influence de la pyridine sur les déplacements chimiques des protons α et δ Pro nous a permis de vérifier cette conclusion ; les solvants aromatiques déplacent vers les champs forts les protons situés en position "anti" par rapport à un groupement carbonyle. Par conséquent, si la liaison peptidique formée avec la proline est cis dans le TRF, le massif correspondant aux protons δ ne doit pas se déplacer, alors que celui correspondant au proton α doit apparaître à champs plus forts. Au contraire, si c'est la forme trans qui existe, c'est l'inverse qui doit se produire. Après avoir fait les corrections dues à la différence de susceptibilité des solvants, nous constatons que le massif situé vers 4,80 ppm ne se déplace pas, alors que ceux vers 4,10 ppm dûs aux protons δ se déplacent de 50 cps vers les champs forts. Ce résultat permet donc de conclure que le résidu prolyle de l'hormone hypothalamique adopte la configuration trans. Cette forme a également été mise en évidence dans l'oxytocine (39) et dans la lysine vasopressine (22).

Dans les amides N-substitués, les atomes d'hydrogène qui se trouvent dans des positions simulant celles des protons α et δ du résidu prolyle sont protégés différemment suivant qu'ils se trouvent en position "syn" ou "anti" par rapport à l'atome d'oxygène du groupement carbonyle. JERIG (40) a étudié, en solution dans l'eau, une série de composés de la forme :



Lorsque $R_2 \equiv CH_3$, les deux groupements N-méthyl sont magnétiquement différents ; celui en position syn par rapport à l'oxygène du carbonyle de la fonction amide apparaît à champ magnétique plus fort que le groupe en position trans, ceci à cause de l'anisotropie diamagnétique de la fonction carbonyle. L'écart entre les positions des groupements syn et anti est dans tous les cas de l'ordre de 10 à 15 cps.

Ce résultat nous permet d'expliquer facilement l'existence des deux pics à 3,32 et 3,42 ppm de même intensité sur le spectre du dipeptide PCA - His - DMA en solution aqueuse. Le premier correspond au groupement méthyle syn par rapport au C = O, le second à celui en position anti.

3 - Résidu histidyle

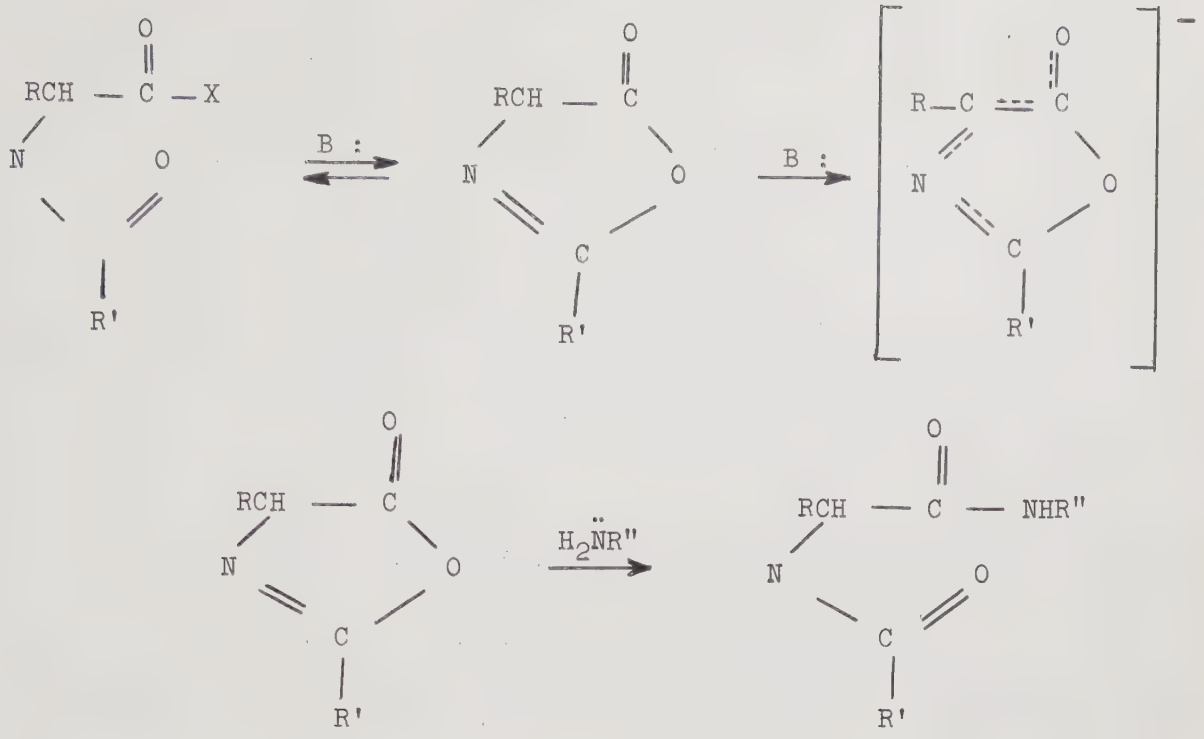
a) CH imidazoliques

De tous les atomes d'hydrogène présents dans les peptides examinés ici, ceux portés par les carbones C-2 et C-4 du noyau imidazolique du résidu histidyle sont les plus facilement identifiables sur les spectres de résonance magnétique nucléaire, à cause des positions à champs faibles de leurs signaux de résonance. Lors de perturbations physiques ou chimiques, des changements dans les valeurs des déplacements chimiques de ces protons peuvent donner des informations sur les effets électroniques à l'intérieur même des molécules. L'écart entre les deux résonances C4H et C2H indique l'état de protonation du cycle imidazolique. Nous avons relevé dans le tableau suivant les valeurs des déplacements chimiques de ces deux protons pour tous les composés étudiés contenant le résidu histidyle. Le tableau IV fait ressortir qu'en solution aqueuse (pD = 9), le cycle imidazolique du TRF n'est pas protoné ($\Delta\delta$ = 70 Hz) ; par contre à pD = 1, le cycle se charge positivement et l'écart passe alors à 135 Hz.

	pD	δ_{C4H} (ppm)	δ_{C2H} (ppm)	$\Delta\delta_{C(4-2)H}$ (Hz)
Histidine (27)	12,5	7,40	8,15	75
"	5,5	7,52	8,22	70
"	0,5	7,96	9,17	121
Acétyl histidine	6	7,78	9,12	134
	1	7,86	9,20	134
PCA-His-OMe	7	7,47	8,25	78
PCA-His-$N(CH_3)_2$	11	7,45	8,21	76
TRH-ACOH	6,5	7,78	8,90	112
TRH	9	7,53	8,23	70
"	1	7,98	9,32	134

TABLEAU IV : Valeurs des déplacements chimiques des protons imidazoliques C4H et C2H par rapport au TMS externe. concentrations : 0,2 M dans D_2O.

Sur les spectres RMN du TRF synthétisé par STUDER, le massif attribué au proton C4H imidazolique est constitué d'un pic intense à 7,53 ppm et d'une bande satellite à 7,47 ppm, tandis que le proton C2H apparaît simple à champ plus faible. L'intégration comparative de ces deux massifs donne un rapport d'intensité 1 : 1 ; la seule explication possible du dédoublement du pic dû au proton C4H est une racémisation partielle au niveau du carbone C_α de l'histidine. Lors de la synthèse de peptides physiologiquement actifs, il est important de savoir si l'activité biologique est bien due à la molécule dont on vient de faire la synthèse et non pas à des traces d'un diastéréoisomère hautement actif. Malheureusement, il est souvent difficile de séparer les peptides qui ne diffèrent que par la configuration des atomes. C'est pourquoi, une préoccupation majeure en synthèse peptidique est d'éviter la racémisation des centres optiquement actifs. Le centre d'asymétrie susceptible de perdre son intégrité optique durant la formation de la liaison peptidique est le carbone α adjacent au groupe carbonyle ; la racémisation de ce centre a lieu surtout par l'intermédiaire d'une 5 oxazolone :



ou par ionisation directe du proton porté par le carbone α :

l'anion obtenu dans les deux cas étant incapable de retenir l'asymétrie (41).

Si la racémisation est minimisée par l'emploi de solvants aussi peu polaires que possible, elle est favorisée non seulement par une élévation de température, mais aussi par la présence d'une base quelconque, pouvant même être le groupe amine du second partenaire.

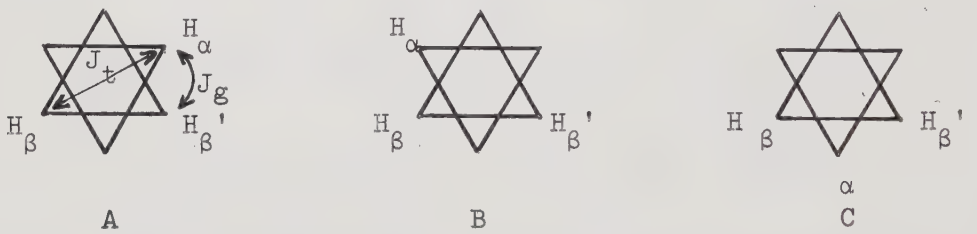
Dans la synthèse du TRF réalisée au C.R.P.P., deux risques de racémisation sont à craindre. Le premier intervient au moment de l'hydrolyse de l'ester méthylique du dipeptide PCA-His puisque cette réaction a lieu en milieu très basique. Le second apparaît lors du couplage du dipeptide PCA-His-OH avec le prolinamide par la méthode de la DCCI (dicyclohexylcarbodiimide).

Notre hypothèse de racémisation partielle est compatible avec le fait que seul le proton C4H est perturbé. L'autre proton imidazolique a en effet une position telle que dans les deux isomères optiques il est à l'extérieur de la molécule ; en conséquence, sa position est peu influencée par les interactions stériques avec le reste de la molécule, contrairement à celle du proton C4H. Le taux de racémisation du TRF provenant du laboratoire HOFFMAN-LAROCHE de Bâle, est de l'ordre de 10 à 15 %, tandis que celui de l'hormone synthétisée au C.R.P.P., lors du premier essai, atteint 40 %. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode

générale pour s'assurer que la condensation de deux acides α aminés s'effectue sans altération des signes optiques des deux centres asymétriques qui se trouvent réunis dans le dipeptide ainsi synthétisé. Le plus souvent, un même dipeptide est préparé par deux voies différentes et les propriétés physiques, en particulier le pouvoir rotatoire et la pureté chromatographique, des deux composés obtenus sont comparées. Récemment, la résonance magnétique nucléaire s'est révélée être un outil efficace pour détecter la présence de diastéréoisomères dans les esters de quelques dipeptides grâce à l'observation des raies de résonance des groupements méthyle (42).

b) Analyse conformationnelle de la chaîne latérale du résidu histidyle

Le résidu histidyle contient le groupement $CH-CH_2$ qui peut prendre préférentiellement les trois formes étoilées représentées ci-dessous :



A B C

Les spectres de résonance magnétique nucléaire, et plus précisément les valeurs des constantes de couplage spin-spin ont permis de déterminer les populations de ces trois formes dans de nombreux composés. Les données spectroscopiques peuvent être analysées de deux manières différentes, chacune d'elles faisant intervenir de nombreuses hypothèses et approximations. De ce fait, il faut mettre beaucoup de circonspection dans leur utilisation. De plus, il existe une indétermination entre les deux formes A et B provenant de la difficulté à caractériser les deux protons portés par le carbone β.

Dans l'hypothèse d'une réorientation rapide autour de la liaison C-C, la première de ces méthodes permet, à partir des constantes de couplage mesurées $J_{\alpha\beta}$ et $J_{\alpha\beta'}$, d'évaluer les populations de chaque rotamère en supposant que les constantes de couplage J_g et J_t entre atomes d'hydrogène gauche et trans les uns par rapport aux autres sont les mêmes quel que soit le rotamère. Bien que cette approximation introduise des erreurs dans le calcul des populations relatives a, b et c des trois formes A, B et C, elle renseigne sur les populations de ces rotamères dans les différents peptides étudiés.

Chaque constante $J_{\alpha\beta}$ ou $J_{\alpha\beta'}$ s'exprime comme la somme des contributions de chaque forme étoilée :

$$J_{\alpha\beta} = a\,J_t + b\,J_g + c\,J_g \qquad (I)$$
$$J_{\alpha\beta'} = a\,J_g + b\,J_t + c\,J_g \qquad (II)$$

En tenant compte de la normalisation des trois populations relatives :

$$a + b + c = 1 \qquad (III)$$

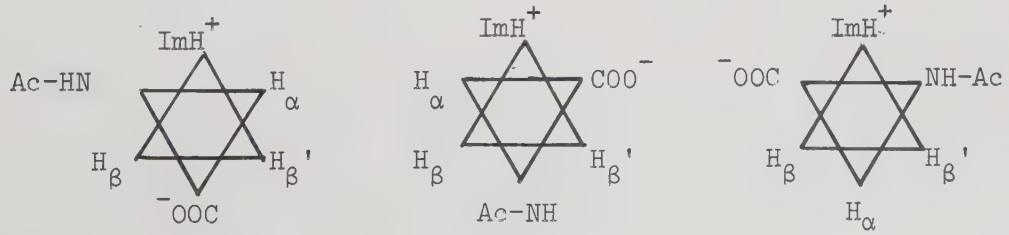
nous avons un système de trois équations à trois inconnues que l'on résoud comme un système de CRAMER :

$$a = \frac{\begin{vmatrix} J_{\alpha\beta} & J_g & J_g \\ J_{\alpha\beta'} & J_t & J_g \\ 1 & 1 & 1 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} J_t & J_g & J_g \\ J_g & J_t & J_g \\ 1 & 1 & 1 \end{vmatrix}} \qquad b = \frac{\begin{vmatrix} J_t & J_{\alpha\beta} & J_g \\ J_g & J_{\alpha\beta'} & J_g \\ 1 & 1 & 1 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} J_t & J_g & J_g \\ J_g & J_t & J_g \\ 1 & 1 & 1 \end{vmatrix}} \qquad c = 1-(a+b)$$

La détermination de a, b et c à partir des deux constantes de couplage vicinales mesurées, est subordonnée à la connaissance des valeurs exactes de J_t et J_g. Dans la littérature, les auteurs ont utilisé les valeurs proposées par ABRAHAM et Mc LAUGHLAN (43) :

$$J_t = 13{,}56 \text{ Hz} \quad ; \quad J_g = 2{,}60 \text{ Hz}$$

Si nous considérons l'acétyl-L-histidine (fig. 4), les deux constantes de couplage $J_{\alpha\beta}$ et $J_{\alpha\beta'}$, déterminées à partir du massif dû au proton CH(α), sont égales à 6 et 9 Hz. La résolution du système de CRAMER conduit aux populations indiquées dans le tableau V.



A B C

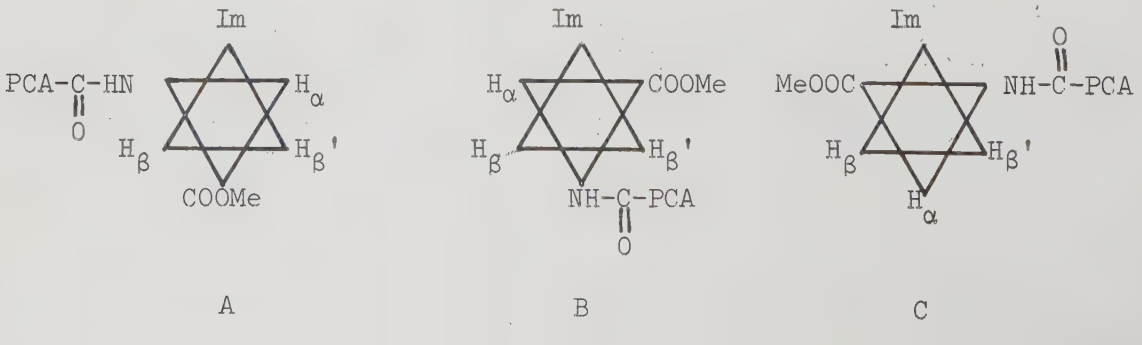
Signalons que MATHUR indique que le rotamère A prédomine (44).

Ces structures en solution aqueuse peuvent être rapprochées des premières données cristallographiques sur l'acétyl-L-histidine publiées par MARSH (45). A l'état solide, la maille contient deux molécules de conformation totalement différente ; l'une d'elles correspond au rotamère A défini ci-dessus, tandis que l'autre correspond à la forme repliée C. Le fait de trouver deux conformations différentes dans la même maille montre que les forces intermoléculaires par liaison hydrogène jouent un rôle important dans la structure de la molécule. En solution aqueuse, les interactions mises en jeu sont différentes de celles qui existent à l'état solide et favorisent les formes A et B.

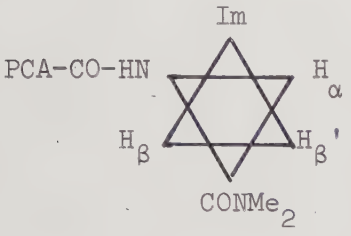
Composé	$J_{\alpha\beta}$	$J_{\alpha\beta'}$	a	b	c
1-méthyl-histidine (46)	7,27	6,02	0,43	0,31	0,26
Histidine (46)	7,87	5,16	0,48	0,23	0,29
Acétyl-histidine	9 6	6 9	0,58 0,31	0,31 0,58	0,11 0,11
PCA - His - ME	9 6	6 9	0,58 0,31	0,31 0,58	0,11 0,11
PCA - His - DMA	7	7	0,40	0,40	0,20
TRF	8	8	0,50	0,50	-

TABLEAU V : Populations fractionnaires des trois rotamères étoilés au niveau de la liaison $C_\alpha - C_\beta$ de l'histidine.

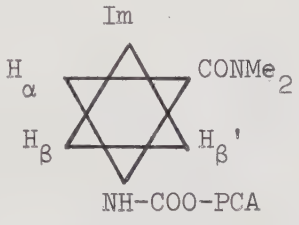
Pour le dipeptide PCA - His - ME, les constantes de couplage $J_{\alpha\beta}$ et $J_{\alpha\beta'}$ sont les mêmes (fig. 6) ; par conséquent, pour ce composé, ce sont encore les formes étoilées A et B qui prédominent.



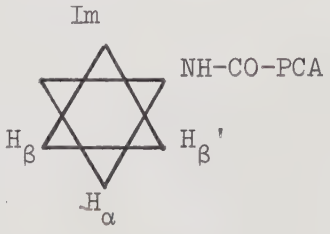
Sur le spectre du dipeptide PCA - His - DMA, le massif correspondant au groupement méthylène β de l'histidine est caché par les signaux de résonance des deux groupes méthyle (fig. 7). Le massif dû au proton C_α H du résidu histidyle apparaît sous la forme d'un triplet symétrique, ce qui semble indiquer qu'il y aurait libre rotation autour de la liaison $C_\alpha - C_\beta$, les deux protons β devenant équivalents. Cette hypothèse nous semble peu vraisemblable, par comparaison avec les résultats précédents. La résolution du système de CRAMER montre que les deux conformères A et B prédominent et qu'ils ont même stabilité (tableau V).



A

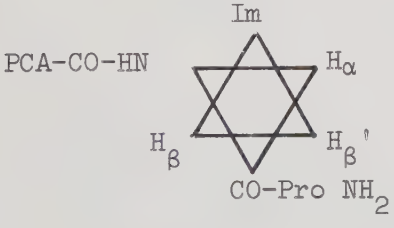


B

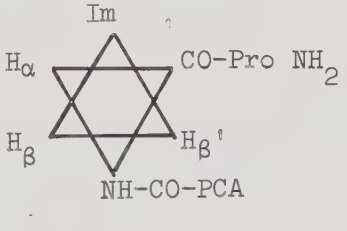


C

En ce qui concerne la molécule de TRF en solution aqueuse, le massif attribuable au $CH_2(\beta)$ de l'histidine ressemble à un massif à huit raies, quant à celui dû au CH(α), c'est sans doute un triplet. Nous formulons cette réserve car la racémisation observée sur le pic correspondant au C_4H pourrait également modifier ces massifs. Les deux constantes de couplage $J_{\alpha\beta}$ et $J_{\alpha\beta'}$ sont identiques et égales à 8 Hz. Le calcul précédemment décrit tend à montrer qu'il existe un équilibre entre les deux formes étoilées A et B, toutes deux étant également favorisées.



A



B

Ce résultat semble raisonnable puisque la forme C est la plus encombrée.

Une seconde méthode permet de déterminer approximativement la géométrie spatiale autour d'une liaison $C_\alpha - C_\beta$; elle consiste à utiliser des courbes de KARPLUS modifiées montrant la dépendance angulaire des constantes de couplage des protons vicinaux (47). PACHLER a suggéré la corrélation :

$$J = 10{,}4 \cos^2 \theta \quad (0 - 90°)$$
$$J = 13{,}6 \cos^2 \theta \quad (90° - 180°) \qquad \text{(IV)}$$

représentée graphiquement par la figure 11 (46).

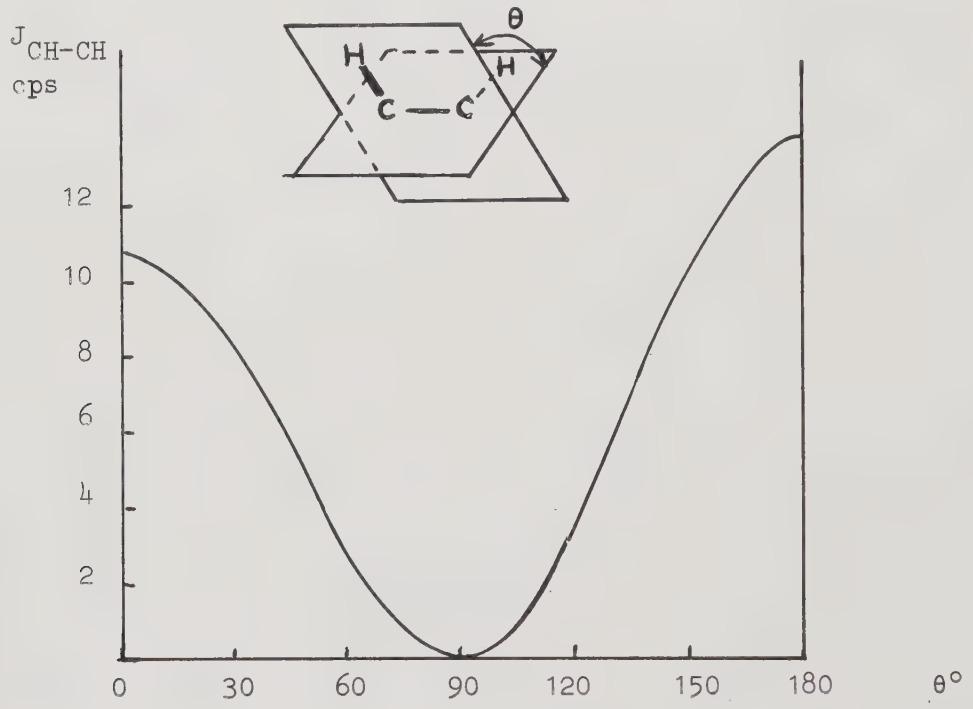
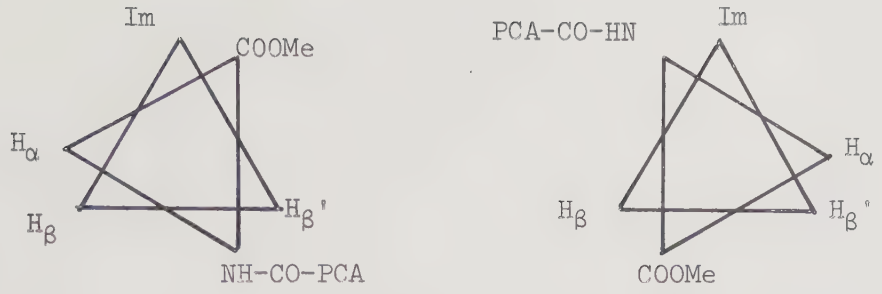


Figure 11 : Dépendance stéréochimique des constantes de couplage des protons vicinaux dans un fragment $C_\alpha H - C_\beta H$.

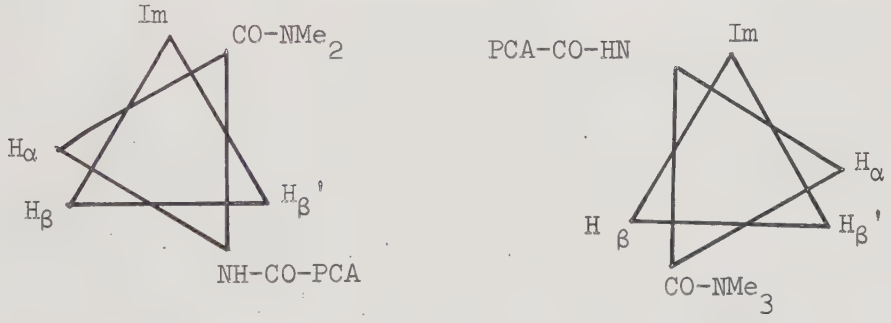
En ce qui concerne le dipeptide PCA - His - ME, les constantes de couplage sont égales à 6 et 9 Hz. Ces deux valeurs conduisent chacune à deux angles θ égaux à 40°, 130° et 20°, 145°. Les couples de valeurs (40° - 145°) et (20° - 130°) sont acceptables.

L'angle que forme les deux liaisons $C_\beta - H_\beta$ et $C_\beta - H_{\beta'}$ étant égal à 120° et les protons β et β' n'ayant pas été distingués, les deux conformations moyennes représentées ci-après sont possibles.

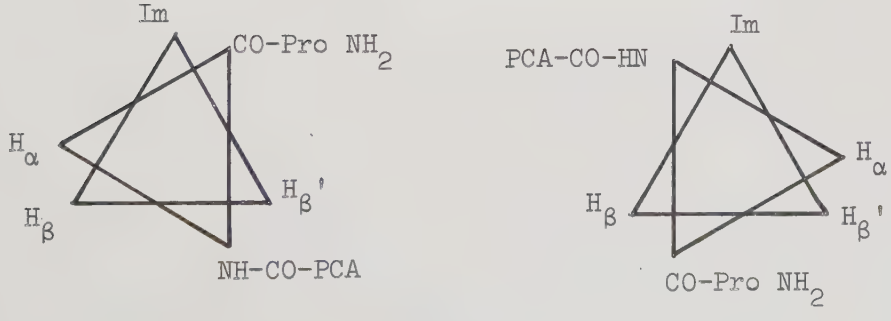


PCA - His - ME

Nous déduisons de la même façon à partir de la corrélation (IV), les couples de valeurs $\theta = 15° - 135°$ et $\theta = 20° - 140°$ respectivement pour PCA - His - DMA et pour le TRF



PCA - His - DMA



PCA - His - Pro NH_2

4 - Structure du squelette

La constante de couplage $J_{NH-C_\alpha H}$ dépend de l'orientation des liaisons NH et CH et permet d'évaluer approximativement la valeur de l'angle dièdre θ entre les plans (HNC_α) et ($NC_\alpha H$). Les conventions internationales élaborées par la commission de nomenclature biochimique I.U.P.A.C. proposent de décrire la conformation d'une unité peptidique par les angles dièdres ψ et ϕ ; ce dernier variant de - 180° à + 180° est relié à θ par la relation :

$$\theta = |\phi - 60| \qquad (48, 49)$$

BYSTROV a étudié les spectres R.M.N. de nombreux dérivés peptidiques en solution dans des solvants polaires (26). Il donne une courbe empirique corrélant la valeur de l'angle θ autour de la liaison $N-C_\alpha$ avec la constante de couplage $^3J_{NH-CH}$ (fig. 12).

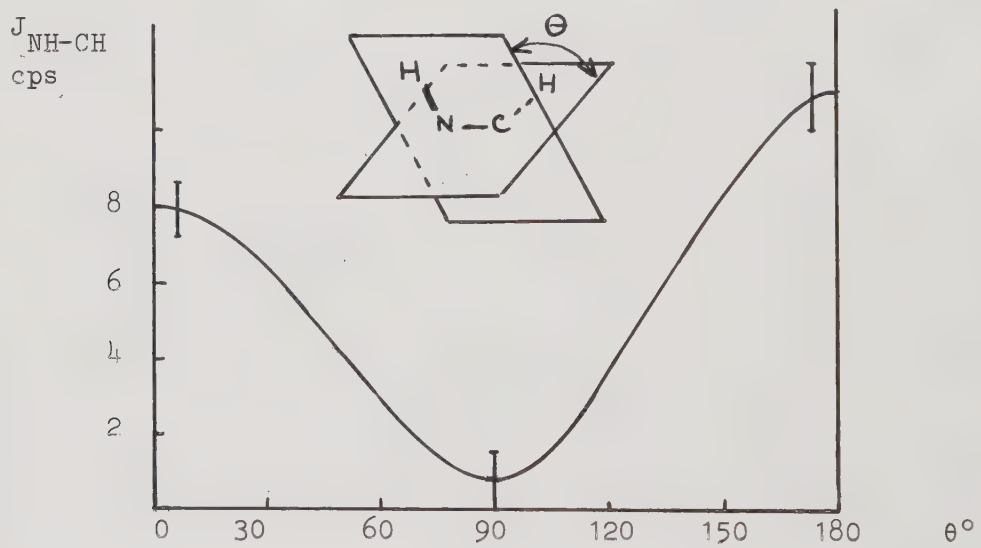
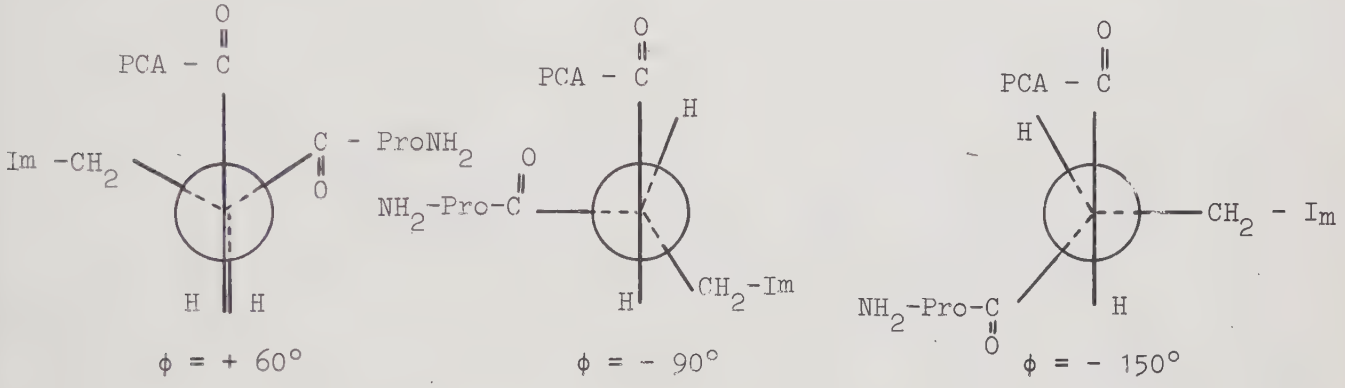


Figure 12 : Dépendance stéréochimique des constantes de couplage des protons vicinaux dans les fragments - CONH - CH ⟨ .

Sur le spectre R.M.N. du TRF en solution dans la pyridine, le signal de résonance du proton NH peptidique du résidu histidyle apparaît sous forme d'un doublet. A l'aide du découplage de spins, nous avons mis en évidence que ce dédoublement résulte du couplage avec le proton vicinal $C_\alpha H$ et que la constante de couplage J_{NH-CH} est égale à 8 Hz (fig. 9). L'utilisation de la courbe représentée sur la figure 12 nous permet de déterminer deux valeurs de θ (0° et 150°) auxquelles correspondent trois géométries définies par ϕ = - 150°,

- 90° et + 60°. Afin de sélectionner parmi ces trois conformations celles qui sont les plus probables, il est nécessaire d'avoir recours à un calcul conformationnel, puisque la résonance magnétique nucléaire ne permet d'atteindre qu'un seul des paramètres définissant la géométrie d'un squelette peptidique. Il nous semble que la dernière valeur doit être rejetée, car elle tombe dans une région stériquement défavorisée ; par contre, les deux premières valeurs conduisent à des structures permises (33). Toutefois, les modèles moléculaires compacts suggèrent que la structure correspondant à $\phi = -150°$ est la plus favorisée du fait de l'éloignement maximum des groupements carbonyle et de la possibilité d'une interaction par liaison hydrogène entre les groupements NH et CO du résidu histidyle.



5 - Action des cations paramagnétiques

La formation de complexe métal-aminoacide en solution peut être étudiée par résonance magnétique nucléaire haute résolution. Quelques études avec l'histidine ont déjà été faites (50, 51). Si les ions métalliques diamagnétiques (tels que Zn^{++}) ne perturbent qu'assez faiblement les déplacements chimiques et la largeur des raies, par contre, les ions paramagnétiques (Cu^{2+}, Co^{2+}) entraînent des modifications importantes du spectre. Nous avons étudié l'effet des ions cuivriques sur l'acétyl-histidine (fig. 13) puis sur le TRF en solution aqueuse. La présence de traces de Cu^{++} dans ces solutions élargit considérablement les pics correspondant aux deux protons CH imidazoliques. Des additions successives d'îons cuivriques font tendre vers zéro la hauteur de ces raies, puis conduisent à une perte de structure des autres massifs du résidu histidyle. Cet élargissement prononcé des pics est dû au fait que l'électron non apparié du métal paramagnétique qui forme le complexe crée des champs magnétiques locaux importants sur tous les noyaux dans son voisinage immédiat. La fluctuation de ces champs due aux mouvements moléculaires, entraîne

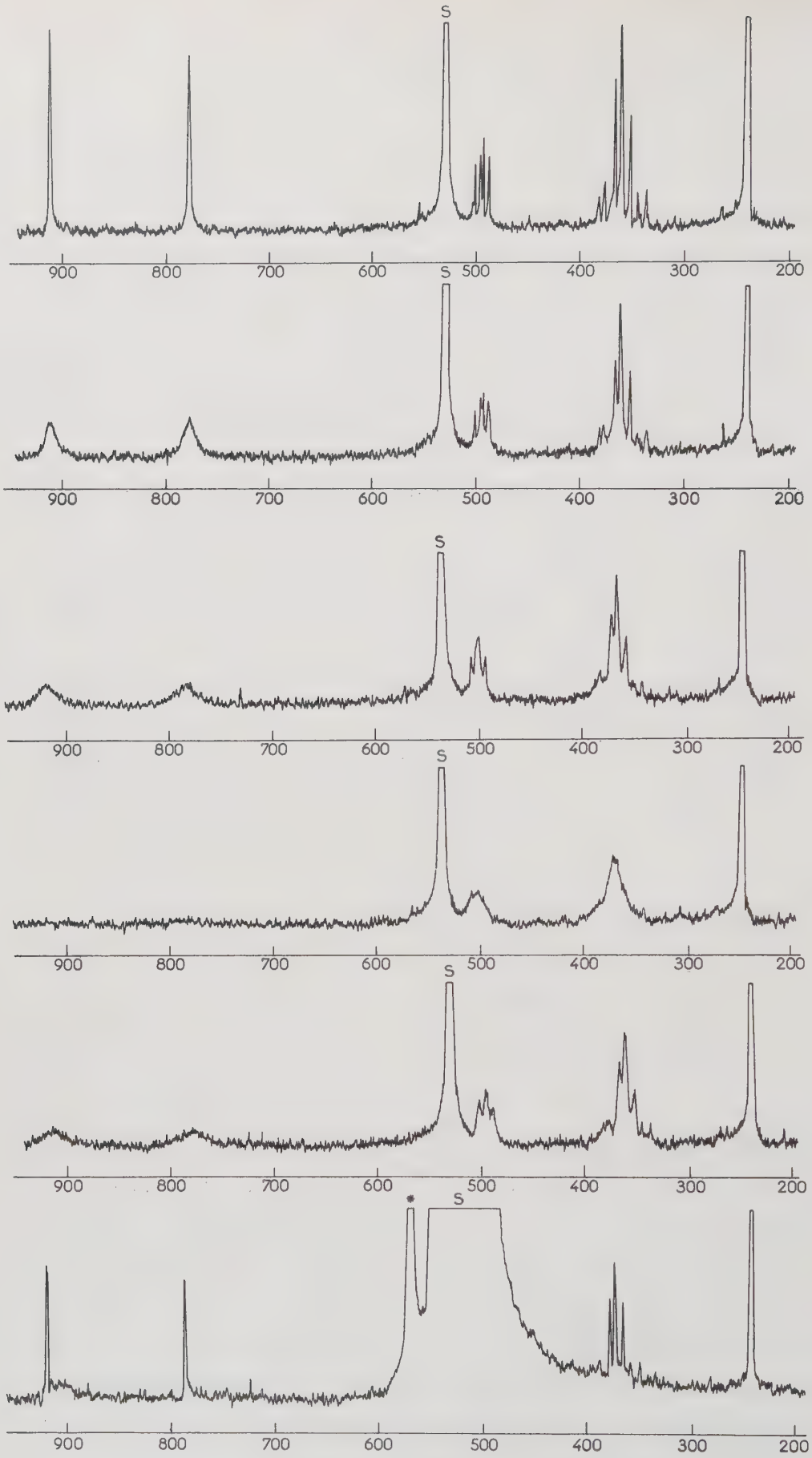


Figure 13 : Influence des ions cuivriques et du pH sur le spectre de l'acétyl-L-histidine en solution dans D_2O (0,4 M/l ; pD = 6).
a) c = 0 ; b) c = $1{,}18.10^{17}$ ions Cu^{++}/cm^3 ; c) c = $2{,}36.10^{17}$ ions Cu^{++}/cm^3 ; d) c = $5{,}92.10^{19}$ ions Cu^{++}/cm^3 ; d_1 : pD = 6 ; d_2 : pD = 5,5 ; d_3 : pH = 1.

une relaxation très importante de ces noyaux. Le degré d'élargissement varie en $1/r^6$, r étant la distance entre le noyau et l'électron non apparié.

On peut conclure de l'ensemble de ces résultats, que la complexation se fait tout d'abord sur le doublet libre de l'azote du cycle imidazolique avant de s'établir sur les groupes peptidiques.

- Troisième partie -

ETUDE CONFORMATIONNELLE DU TRF PAR SPECTROSCOPIE DE VIBRATION

La deuxième technique physicochimique que nous avons utilisée pour étudier l'aspect conformationnel de l'hormone hypothalamique de libération de la thyréostimuline est la spectroscopie de vibration. Déterminer la conformation d'un dérivé peptidique par une telle méthode implique que l'attribution détaillée des spectres ait été faite. En ce qui concerne le TRF, celle-ci est rendue possible par l'utilisation conjointe de plusieurs critères : comparaison des spectres infrarouges et Raman, deutériation des groupements NH, examen du spectre Raman à différents pH et enfin, comparaison avec les spectres des composés modèles cités dans la deuxième partie. Cette dernière étude vise aussi un autre objectif : permettre de distinguer les raies, sensibles à la conformation, qui sont perturbées par addition d'un nouvel acide aminé à la chaîne peptidique.

Dans les deux chapitres qui constituent cette troisième partie, nous allons exposer les résultats obtenus par spectroscopies infrarouge et Raman à l'état solide, et en solution aqueuse.

- Chapitre I -

INTERPRETATION DU SPECTRE INFRAROUGE ET ETUDE CONFORMATIONNELLE DU TRF A L'ETAT SOLIDE

Les composés que nous avons étudiés étant tous des dérivés peptidiques, nous allons tout d'abord décrire les vibrations fondamentales du groupement - CONH -. On sait que le groupe amide trans est caractérisé par neuf bandes d'absorption principales, notées bandes amide A, amide B et amides I à VII. Leur interprétation a fait l'objet d'un grand nombre de travaux (52, 53, 54, 55).

Les bandes amides A et B, situées vers 3300 et 3100 cm^{-1}, ont été attribuées par BADGER et PULLIN (52) respectivement à la vibration de valence νNH et à l'harmonique de la vibration amide II entrant en résonance de FERMI avec la vibration νNH. Les bandes amides I à VII ont été décrites par MIYAZAWA (53, 54) à partir d'un calcul de coordonnées normales des N-méthylacétamides hydrogéné et N-deutérié. Dans le tableau VI sont résumées les distributions d'énergie potentielle des vibrations amides de ces composés (54, 55).

Si certaines corrélations entre le spectre infrarouge et la structure des polypeptides ont été proposées (56), leur appréciation reste souvent délicate dans le cas des chaînes courtes. Récemment, KOYAMA et SHIMANOUCHI (57) ont élaboré une méthode qui permet de déterminer par spectroscopie infrarouge les conformations les plus probables de petites molécules contenant le groupement amide - CONH - ; ils montrent que les absorptions les plus sensibles à la conformation de la chaîne se situent dans les basses régions. Il faut noter toutefois que les vibrations de valence et de déformation correspondant aux groupements N-H et C=O dépendent des liaisons hydrogène intermoléculaires et donc de la structure cristalline.

Compte tenu de ces remarques, nous analyserons plus particulièrement les vibrations amide A, I, II, III et V.

Ce chapitre est divisé en trois sections. Les deux premières concernent l'analyse des spectres de dérivés de la proline et de l'acide pyroglutamique dont les structures cristallines sont connues. Nous nous réfèrerons à ces résultats pour interpréter, dans la troisième section, les spectres des dipeptides PCA - His - ME et PCA - His - DMA ainsi que celui du TRF.

Bandes Amide	Fréquence observée (cm^{-1})	Distribution d'énergie potentielle
Amide A (54)	3470	ν(NH) — Résonance de Fermi
Amide B (54)	3090	2 x Amide II — Résonance de Fermi
Amide I	1660	67 ν(C=O), 10 δ(CCN)
Amide II	1569	48 δ(NH), 38 ν(C'N)
* Amide II'	1485	43 ν(C'N), 13 ν(C'C), 11 $\delta'_s(CH_3\text{-}N)$, 11 δ(ND), 10 δ(C'O)
Amide III	1300	36 δ(NH), 20 ν(C'N), 13 δ(C'O), 12 ν(C'C)
* Amide III'	965	57 δ(ND), 14 r (CH_3N), 10 ν(CN)
Amide IV	628	44 δ(C'O), 26 ν(C'C), 11 δ(CNC)
Amide V	725	73 γ(NH), 17 τ(C'N), 10 γ(C'O)
* Amide V'	510	47 γ(ND), 28 γ(C'O), 21 τ(C'N)
Amide VI	600	75 γ(C'O), 11 τ(C'N), 10 r (CH_3C)
Amide VII	192	55 τ(C'N), 19 γ(NH), 11 τ(CN)

TABLEAU VI : Nombre d'onde et distribution d'énergie potentielle des bandes amide du N-méthylacétamide (55).

* Ces bandes sont relatives au composé N-deutérié.

1 - SPECTRES DE VIBRATION DE L'ACETYL-L-PROLINAMIDE: A Pro A

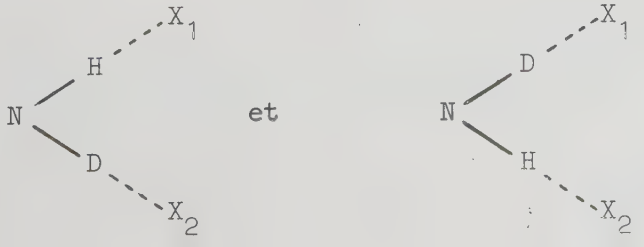
Les spectres infrarouges entre 4000 et 2000 cm^{-1} de l'acétyl-L-prolinamide et de son homologue N-deutérié sont représentés sur la figure 14. Sur la figure 15, nous avons porté leurs spectres infrarouge et Raman entre 1800 et 200 cm^{-1}. Les fréquences et les attributions des bandes sont rassemblées dans le tableau VII.

a) Vibrations de valence νNH

Dans la région des spectres comprise entre 4000 et 2000 cm^{-1}, on attend toutes les vibrations de valence mettant en jeu les atomes d'hydrogène. Nous constatons que par N-deutériation, certaines bandes se déplacent ; elles sont donc attribuables aux vibrations de valence νNH, tandis que celles qui ne sont pas affectées, sont associées aux vibrations des groupements CH.

Le spectre de A Pro A présente deux bandes intenses, l'une fine à 3357 cm^{-1}, l'autre large à 3170 cm^{-1}, qui se déplacent par N-deutériation. Nous les attribuons respectivement aux vibrations de valence antisymétrique et symétrique du groupement NH_2. L'écart entre leurs fréquences résulte non seulement du couplage des deux vibrateurs NH (ν_a NH_2 et ν_s NH_2), mais aussi de la différence des interactions par liaison hydrogène auxquelles ils sont soumis.

Le spectre de A Pro A partiellement deutérié montre entre 3400 et 3100 cm^{-1} quatre bandes principales. Deux d'entre elles, à 3355 et 3170 cm^{-1} ont des fréquences identiques à celles du produit hydrogéné. Leurs intensités diminuent quand le taux de deutériation augmente. Elles appartiennent donc au groupement NH_2 et leur attribution a été précisée précédemment. L'intensité des deux autres bandes à 3325 et 3242 cm^{-1}, qui apparaissent par deutériation partielle, passe par un maximum quand le taux de deutériation augmente. Sur le spectre de A Pro A deutérié à 80 %, elles sont seules relevées (fig.14). Nous les attribuons aux vibrations de valence νNH des groupements NHD. L'existence de deux fréquences νNH pour le groupement amide NHD s'explique par le fait que dans le cristal les deux liaisons NH forment des liaisons hydrogène NH ... X_1 et NH ... X_2 différentes :



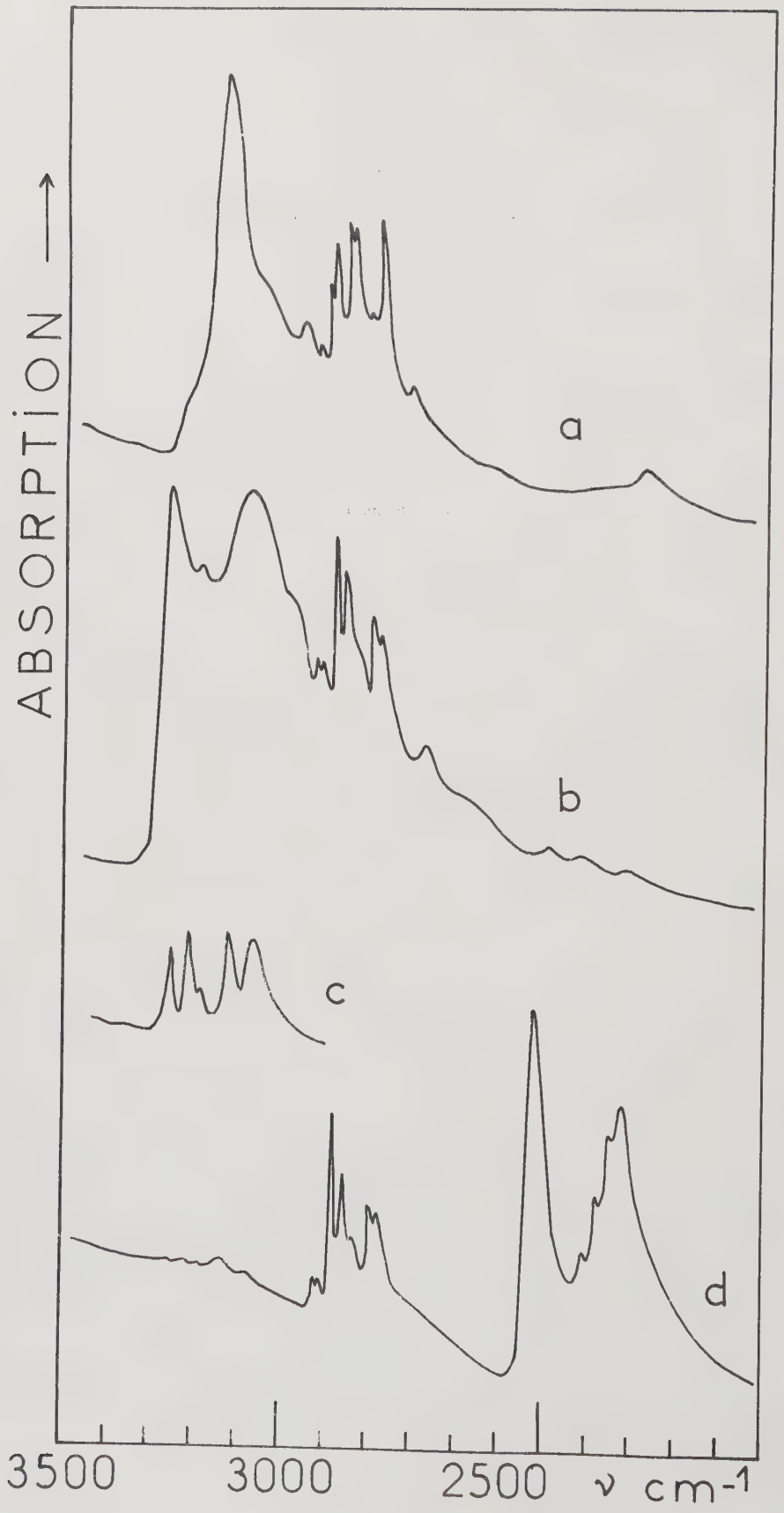


Figure 14 : Spectres infrarouges de a) A Pro MA ; b) A Pro A ; c) A Pro A N-deutérié à 50 % ; d) A Pro A N-deutérié, à l'état solide.

Ceci peut provenir soit de la nature des atomes X_1 et X_2, soit des distances N ... X_1 et N ... X_2.

Le fait que les deux vibrations νNHD sont à des positions différentes de celles des vibrations νNH_2 vérifie que les deux vibrateurs NH sont couplés. L'écart de 83 cm^{-1} entre les deux absorptions νNHD suggère que l'un des groupements NH de A Pro A est beaucoup plus associé par liaison hydrogène que l'autre. Notons que cette conclusion aurait pu être faite uniquement en considérant les largeurs des bandes à 3355 et 3170 cm^{-1} vues sur le spectre de A Pro A.

Afin de préciser l'attribution des deux absorptions νNHD à 3315 et 3242 cm^{-1}, nous avons examiné le N-acétyl-L-proline-N-méthylamide, composé qui ne contient qu'un groupement NH en position trans par rapport au carbonyle. Sa vibration de valence νNH est observée à 3236 cm^{-1} (fig. 14). Ceci nous permet d'attribuer les bandes à 3325 et 3242 cm^{-1} de A Pro A partiellement deutérié respectivement aux vibrateurs NH cis et NH trans.

b) Vibrations de valence νC=O et de déformation δNH_2

Le spectre infrarouge de A Pro A présente entre 1700 et 1600 cm^{-1} trois bandes à 1696, 1676 et 1627 cm^{-1}. Par N-deutériation, celles de plus haute fréquence sont perturbées, tandis que celle à 1627 cm^{-1} ne subit aucune modification. Un calcul de vibration récent a montré que la vibration νC=O d'un amide cis ou trans est couplée avec la vibration de déformation δNH, ce qui entraîne un abaissement de sa fréquence par N-deutériation (55). Ce résultat nous permet d'attribuer l'absorption à 1627 cm^{-1} à la vibration de valence νC=O du groupement acétyle. Les bandes à 1696 et 1671 cm^{-1} vues respectivement sur les spectres de A Pro A et A Pro A - ND_2 sont associées au vibrateur C=O amide. Quant à la vibration de déformation δNH_2, elle est certainement masquée sur le spectre du dérivé hydrogéné par la bande intense C=O acétyle ; par refroidissement à la température de l'azote liquide, elle apparaît à 1659 cm^{-1} et par deutériation, elle se déplace à 1178 cm^{-1} (fig. 15, tableau VII). L'abaissement de la fréquence (25 cm^{-1}) νC=O amide par deutériation montre que les vibrations νC=O et δNH_2 sont en forte interaction. Notons que ce comportement est semblable à celui des vibrations correspondantes de l'acétamide (58, 59). L'absorption qui apparaît en épaule de la bande à 1696 cm^{-1} n'est certainement pas due à une vibration fondamentale, car sa position n'est pas influencée par la deutériation. L'ensemble de cette interprétation est confirmée par l'examen des spectres de A Pro MA.

TABLEAU VII: Spectres infrarouges et Raman de A Pro MA, A Pro A et de leurs analogues N-deutériés à l'état solide.

A Pro MA	A Pro MA (ND)	A Pro A		A Pro A (ND_2)		Attribution
IR	IR	IR	R	IR	R	
		1696 TF		1680 ep		Amide I
1668 TF	1663 TF	1676 F	1627 ep	1671 TF	1630 ep	Amide I
1627 TF	1622 TF	1627 TF	1617 TF	1625 TF	1615 TF	νC=O acétyle
1540 TF						
	1486 m					
1469 m	1461 m	1472 ep	1476 ep	1452 ep	1477 f	δCH_2
1440 TF	1440 TF	1446 TF	1445 TF	1446 TF	1445 TF	δCH_2, δCH_3
1426 TF	1426 TF	1424 TF	1436 ep	1420 F		δCH_3, νCN
1410 TF	1400 TF	1410 ep	1407 ep	1412 TF	1410 f	δCH_3, νCN
		1397 ep				δCH_3
1351 TF	1351 TF	1361 F	1362 m	1362 F	1361 f	$\delta_s CH_3$
1345 ep		1340 m	1340 ep	1343 m		ωCH_2, δCH, γCH
		1327 TF	1328 m	1327 TF		ωCH_2, δCH, γCH
1319 TF	1319 F	1317 m	1320 m	1318 m		ωCH_2, δCH, γCH
1301 F	1296 F	1298 TF	1298 m	1298 TF		ωCH_2, δCH, γCH
1285 m						
1265 F	1268 TF	1260 F	1259 F	1262 m	1259 m	t CH_2
1238 m	1240 m	1241 m	1242 F	1242 f	1242 m	t CH_2
1196 TF	1200 F	1191 TF	1193 F	1201 m	1200 ep	t CH_2
1180 m	1181 m			1178 F		δ ND_2
1162 ep		1159 ep	1170 ep			
1152 ep	1160 F	1154 TF	1161 F	1152 F	1165 m	
	1117 F					
1107 F	1110 ep	1104 TF	1107 ep			t NH_2
1081 m	1083 m	1095 F	1097 TF	1098 m		
				1077 tf		
1053 ep	1054 F	1065 m	1065 m	1065 m		
1044 F	1045 F	1037 m	1024 ep	1036 m		r CH_2, r CH_3, sq
1019 F	1021 F	1024 m	1021 TF	1022 m	1020 TF	r CH_2, r CH_3, sq
999 F	999 F	994 F	996 F	995 F	995 m	r CH_2, r CH_3, sq
958 m	953 TF	964 m	965 F	961 f	961 m	r CH_2, r CH_3, sq
			940 f			r CH_2, r CH_3, sq
925 ep	924 ep			924 TF	920 TF	t ND_2
917 m	918 m	918 m	921 TF	918 m		
911 ep	908 m	908 m	909 m	898 m	897 m	
874 f	876 f	872 m	874 F	871 m	871 m	sq et r CH_2
846 m	845 m	852 m	852 TF	848 m	848 TF	sq et r CH_2
834 ep	830 m	814 f	807 m			sq et r CH_2
		792 f	777 m	791 tf	790 F	sq et r CH_2
785 F	755 f	728 TF	728 TF	718 m	719 F	Amide IV
734 F						
		678 TF	660 ep			ω NH_2
639 F	647 m					
		632 f		627 f		sq
621 F	624 m	622 TF	623 TF	612 TF	626 F	δC=O acétyle
600 f	601 f	616 ep		604 ep	608 ep	δC=O acétyle
589 m	589 m	592 f	594 f			sq
		568 TF	571 m	564 m	563 m	Amide VI
548 F	548 TF	548 TF	547 TF	540 TF	541 F	γC=O acétyle
				514 TF		ω ND_2
440 F	440 TF	438 TF	440 TF	434 F	436 m	
384 m	383 m	384 f	382 TF	382 f	379 m	
334 F	333 m	336 F	334 m	323 f	318 m	sq
298 m	298 m	291 m	292 f	289 f		sq
261 m	260 m	246 m		247 f		sq

TF = très fort - F = fort - m = moyen - f = faible - ep = épaule.

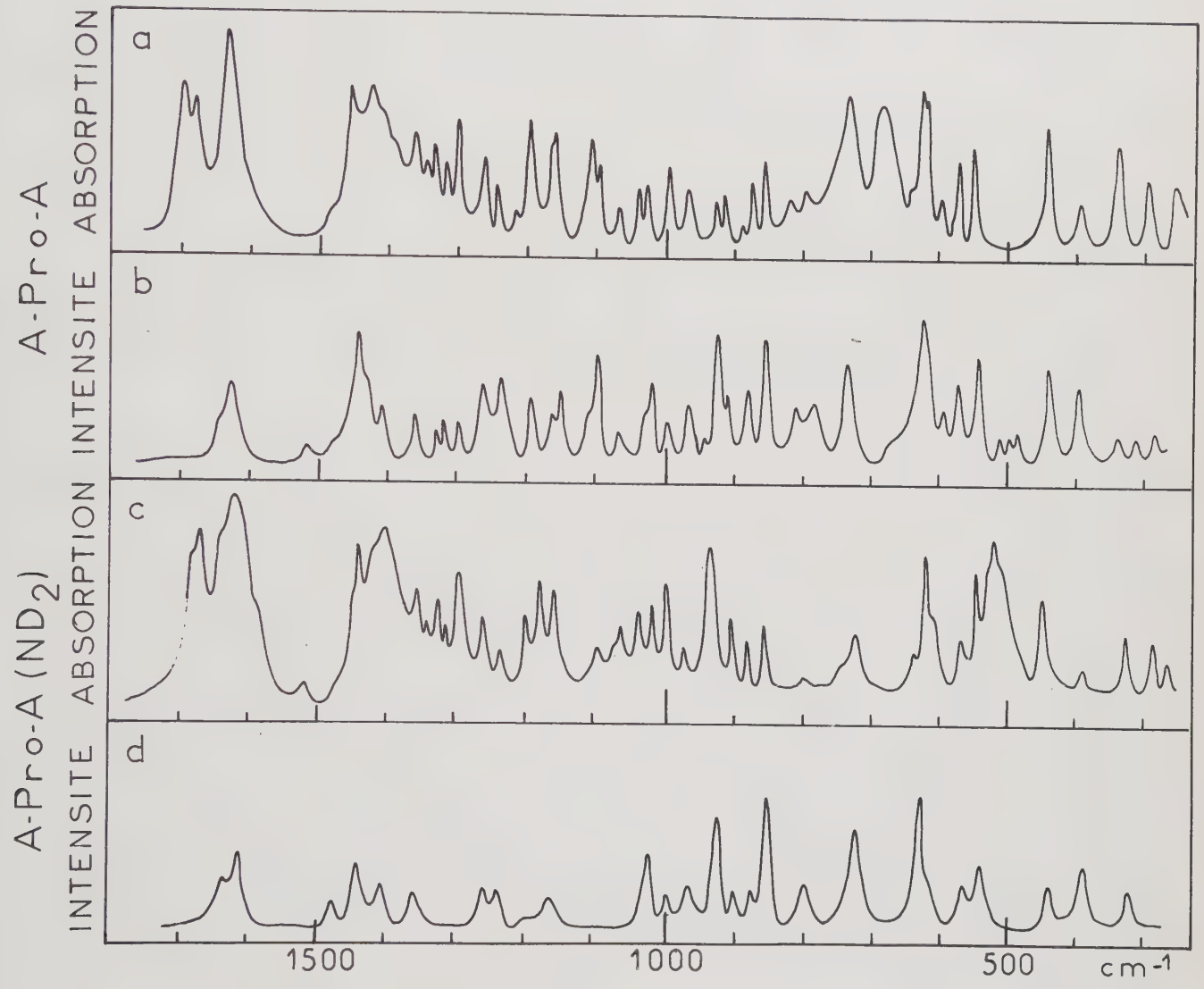


Figure 15 : Spectres infrarouges (a, c) et Raman (b, d) de l'acétyl-L-prolinamide (a, b) et de son dérivé N-deutérié (c, d) à l'état solide.

Cette analyse suggère que les deux groupements carbonyles de A Pro A ont des environnements très différents. Le carbonyle de la fonction acétyle est certainement en interaction forte avec le groupement NH trans, tandis que celui de la fonction amide semble libre.

Cette conclusion est confirmée par la grande analogie des spectres de A Pro A et A Pro MA deutériés entre 1800 et 1600 cm^{-1}. En effet, la structure cristalline de l'acétyl-L-proline-méthylamide déterminée par rayons X montre l'existence de liaisons hydrogène intermoléculaires entre le groupement NH d'une molécule et le carbonyle du groupe acétyle d'une autre molécule (N...O = 2,875 Å), le carbonyle du groupe amide restant libre (60).

c) Vibrations de déformation

Les autres vibrations auxquelles nous allons nous intéresser sont celles qui pourraient être influencées par la conformation de la molécule, ou les actions intermoléculaires.

La bande large à 678 cm^{-1} sensible à la fois à la N-deutériation et aux variations thermiques, qui, de plus, est absente du spectre Raman, est attribuée à la vibration de balancement ωNH_2 (fig. 15, tableau VII).

Dans le domaine spectral compris entre 800 et 500 cm^{-1} sont aussi attendues, outre deux vibrations du noyau pyrrolidine, les quatre vibrations de déformation des deux carbonyles. La comparaison des spectres infrarouges et Raman de A Pro A et A Pro MA permet de situer les vibrations appartenant au groupement acétyle à 622 et 548 cm^{-1} ; elles sont communes à ces deux composés et ne sont pas perturbées par la deutériation. La largeur de la bande à 728 cm^{-1} et l'influence qu'elle subit par N-deutériation nous incite à penser qu'elle provient de la vibration $\delta C=O$ du groupement amide. Quant à la quatrième vibration de déformation, nous la situons à 568 cm^{-1}. Les couplages vibrationnels déplacent ces deux derniers mouvements à 785 et 639 cm^{-1} sur le spectre de A-Pro-MA (fig. 15).

Enfin, nous faisons correspondre les deux bandes à 632 et 592 cm^{-1} aux deux vibrations de squelette attendues. Signalons que ces dernières se trouvent à 667 et 577 cm^{-1} sur le spectre Raman de la L-proline (61).

2 - SPECTRES DE VIBRATION DU L-PYROGLUTAMYL-METHYLAMIDE : PCA-MA

L'attribution des spectres infrarouge et Raman du L-pyroglutamyl-méthylamide est faite par comparaison avec celles de la pyrrolidone (62) et de l'acide pyroglutamique (28). En outre, nous avons utilisé les données cristallographiques publiées récemment par AUBRY (63). Le L-pyroglutamyl-méthylamide cristallise dans le système monoclinique $P2_1$ avec deux molécules par maille. L'examen des distances interatomiques dans le cristal montre que l'atome d'oxygène du groupement carbonyle du cycle pyrrolidone de chaque molécule participe à deux liaisons hydrogène distinctes. La première interaction s'établit avec le site NH de la fonction amide trans de la molécule immédiatement inférieure ($dO_1 \ldots N_2$ = 2,88 Å) ; ces liaisons forment deux chaînes antiparallèles le long de Oz. La seconde interaction fait intervenir le site NH du cycle de la molécule immédiatement supérieure ($dO_1 \ldots N_1$ = 2,93 Å) ; ce deuxième type de liaison hydrogène forme des ponts suivant Oy entre les deux chaînes. Il apparaît, en outre, que l'atome d'oxygène de la fonction amide secondaire est dans un environnement entièrement aliphatique et ne participe donc à aucune liaison hydrogène. A partir des coordonnées atomiques publiées (63), nous avons dessiné la projection (x, z) de la maille du cristal de PCA - MA (figure 16).

Les spectres infrarouge et Raman entre 4000 et 200 cm^{-1} de PCA-MA et de son homologue N-deutérié sont représentés sur les figures 17 et 18. Les fréquences sont rassemblées dans le tableau VIII.

a) Vibrations de valence νNH

Il est bien connu que la fréquence de la vibration de valence d'un groupement XH est abaissée par formation d'une liaison hydrogène, et ceci d'autant plus que l'interaction est forte, c'est-à-dire que la distance XH...Y est courte.

Le spectre infrarouge de PCA-MA présente deux bandes intenses à 3290 et 3228 cm^{-1} qui se déplacent par deutériation à 2430 et 2393 cm^{-1} (fig. 17). Elles sont donc attribuables aux deux vibrations νNH. Afin de préciser l'attribution de ces deux bandes, nous comparerons ce spectre avec ceux de A Pro MA et du DL-PCA, composés pour lesquels les structures cristallines sont connues (60, 64). Les groupements NH peptidiques de A-Pro-MA et PCA-MA étant engagés dans des liaisons hydrogène de longueur très proche, respectivement 2,875 et 2,88 Å, leurs fréquences sont attendues très voisines. Sur le spectre de

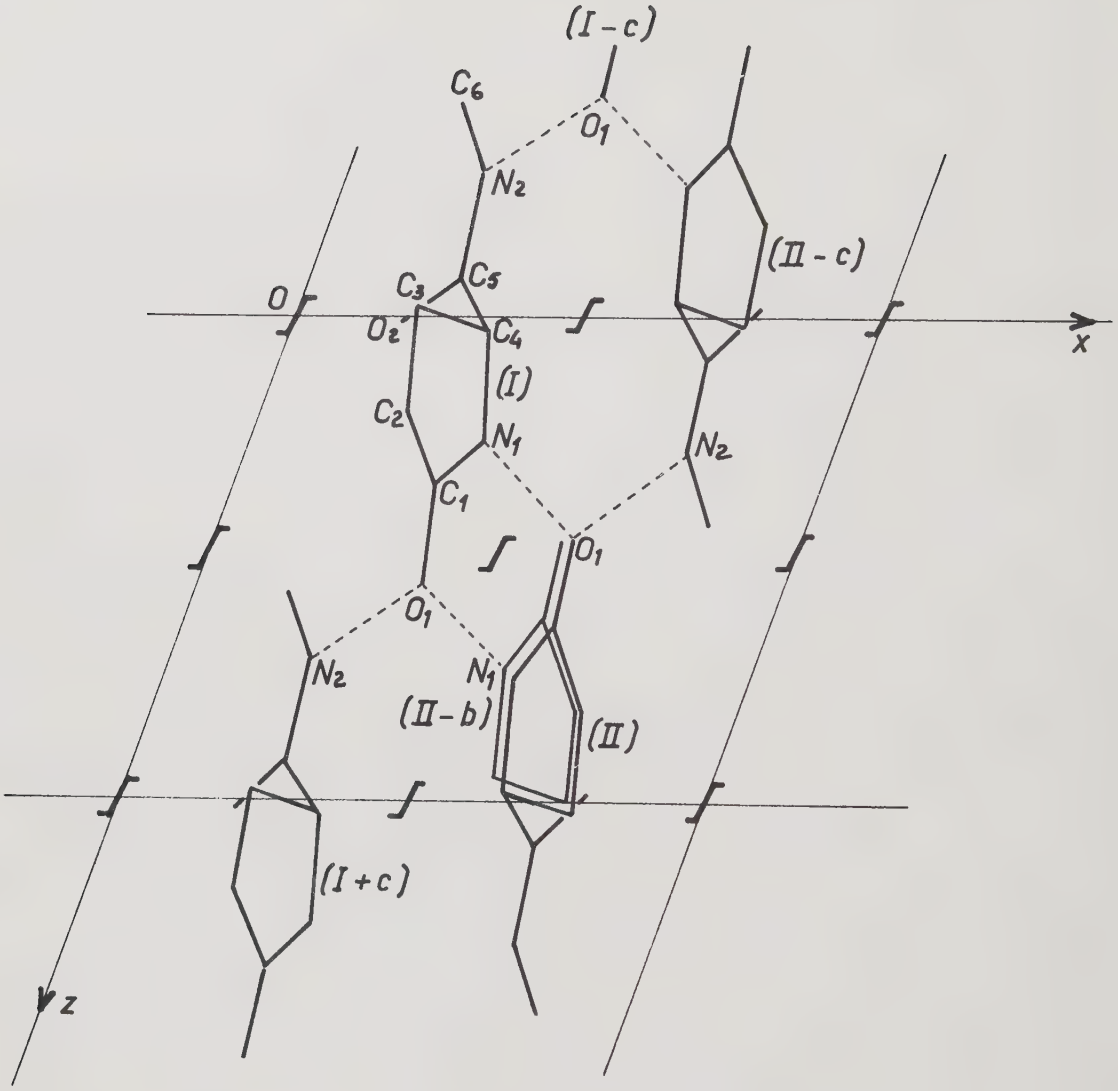


Figure 16 : Projection (x, z) de la maille du cristal du L-pyroglutamyl-méthylamide.

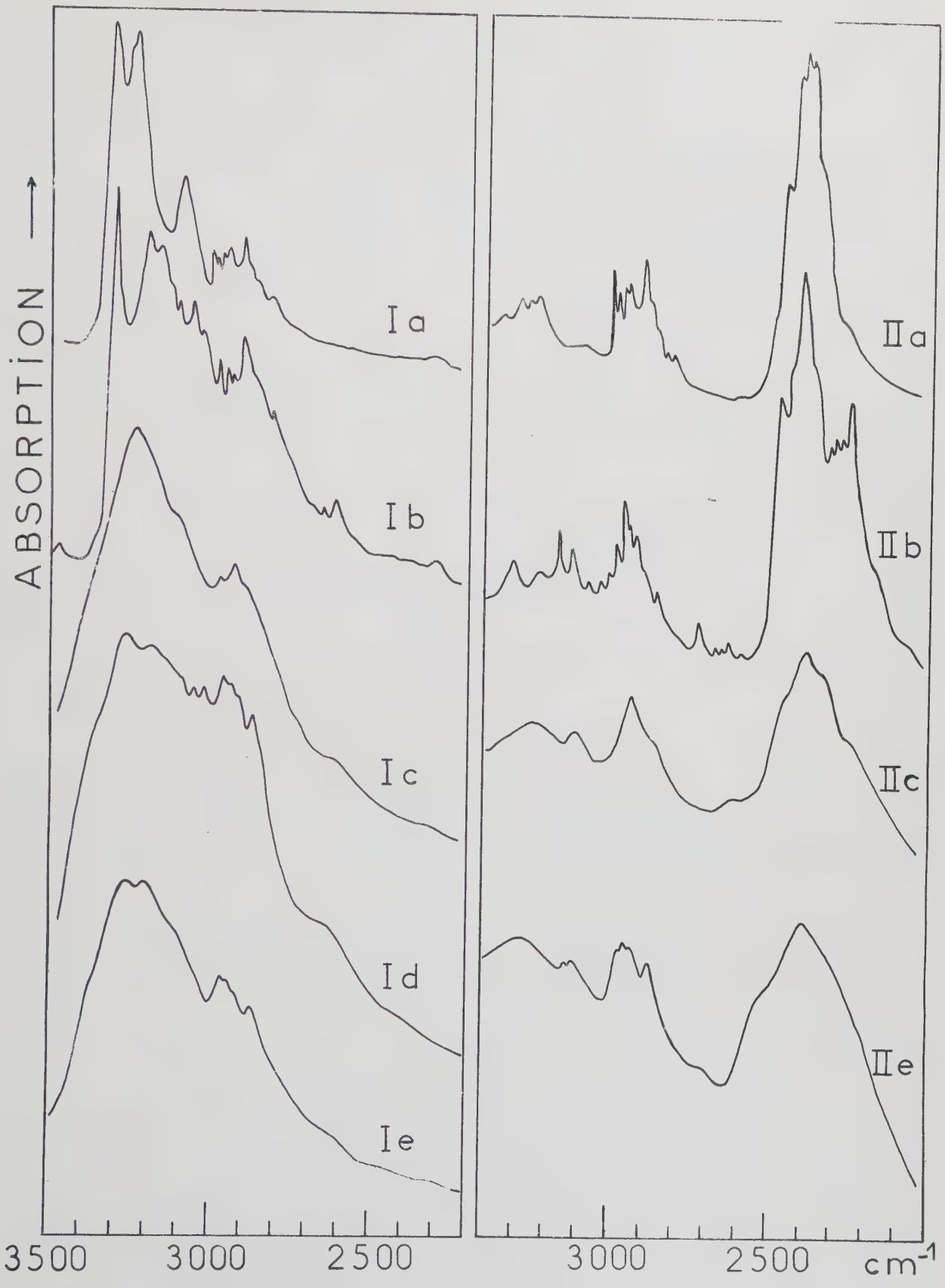


Figure 17 : Spectres infrarouges de I_a) PCA-MA, I_b) PCA-His-ME, I_c) PCA-His-DMA, I_d) Z-His-Pro A, I_e) TRF, et II_a) II_b) II_c) et II_e) de leurs homologues N-deutériés à l'état solide.

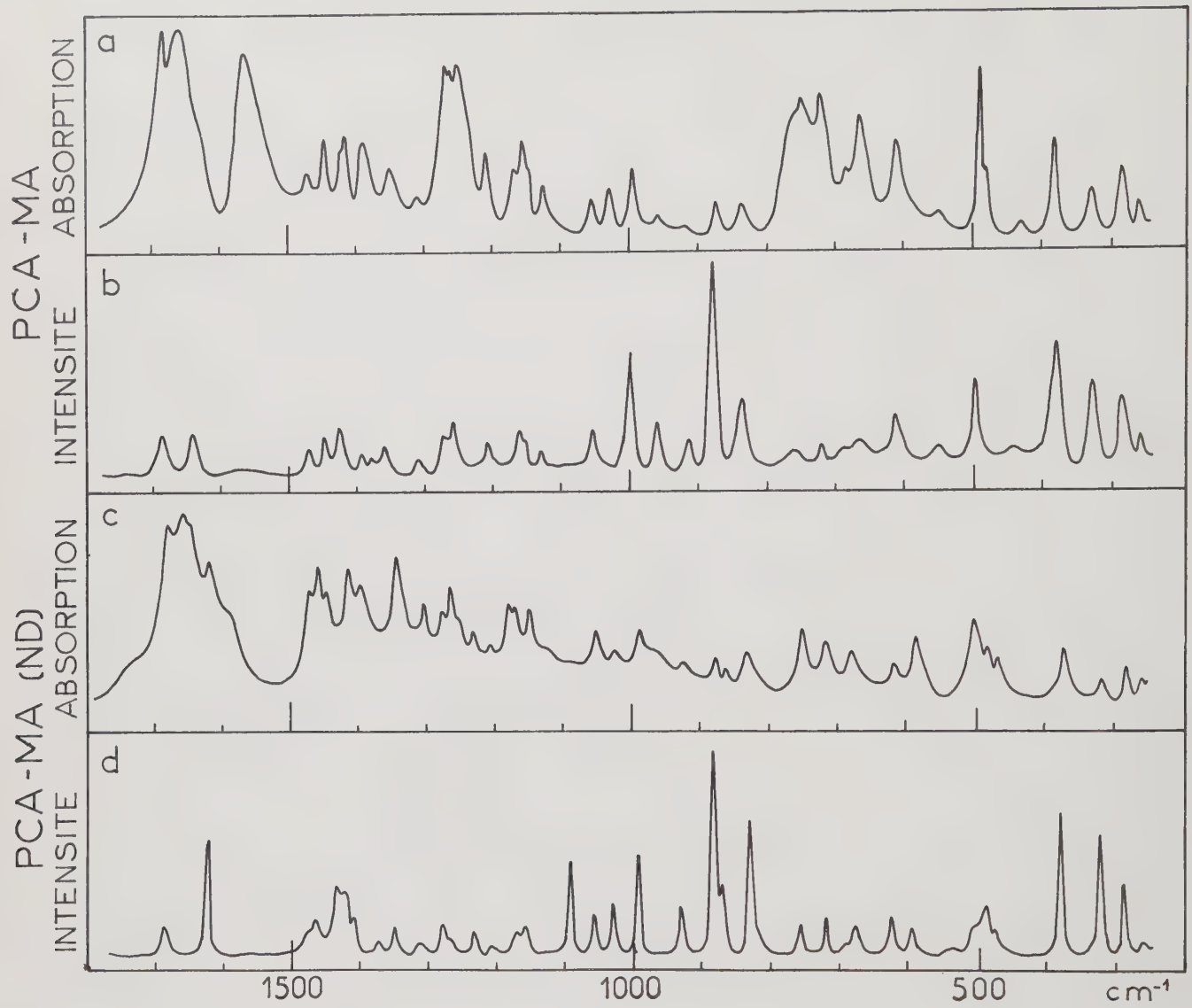


Figure 18 : Spectres infrarouges (a, c) et Raman (b et d) du L-pyroglutamyl-méthylamide (a, b) et de son dérivé N-deutérié (c, d) à l'état solide.

PCA-MA		PCA-MA (ND)		Attribution
IR	R	IR	R	
		1750 ep		
1687 TF	1688 F	1682 TF	1685 F	Amide I
1665 TF		1659 TF		
		1649 ep		
1642 ep	1641 F	1620 F	1625 TF	νC=O (PCA)
		1596 ep		
1567 TF	1570 tf	-	-	Amide II
1545 ep				
1467 m	1468 m	1472 F	1472 ep	δCH_2
-	-	1460 TF	1466 m	Amide II'
1445 F	1447 F	1450 F		δCH_3 + comb.
1421 ep			1427 F	
1418 F	1423 F	1413 F	1421 ep	δCH_2 (α C=O)
1390 F	1395 f	1401 F	1407 m	δCH_3
1377 ep	1377 f		1370 f	
1351 m	1361 m	-	-	δNH (PCA)
		1343 TF	1347 m	
1303 f	1303 m	1306 m	1310 f	
1272 ep	1272 ep	1277 ep	1280 m	ωCH_2
1267 TF				
1264 ep		1265 m	1265 ep	tCH_2
1254 TF	1258 F	-	-	Amide III
1230 ep		1230 f	1234 m	
1208 F	1208 m	1208 f	1204 f	
		1178 m		δND (PCA)
1164 ep	1162 m	1170 m	1168 ep	
1154 F	1153 ep	1152 m	1156 m	
1150 ep		1149 ep		rCH_3
1123 m	1126 f	1130 f		ν C-N
			1085 TF	
1054 m	1056 F	1051 m	1056 F	
1034 m		1028 f	1029 F	
997 m	1000 TF	988 m	991 TF	
		962 ep		Amide III'
959 f	960 F			
912 f	915 m	923 f	927 F	
877 m	881 TF	876 f	882 TF	Squelette
		863 f	870 F	
833 m	834 F	827 m	831 TF	
770 ep	-	-	-	γNH (PCA)
764 TF	-	-	-	Amide V
752 F	756 m	750 F	753 m	r CH_2
721 TF	722 m	717 m	720 F	γC=O (PCA)
689 ep	690 ep		690 ep	
663 TF	668 m	678 m	681 m	δC=O (amide)
611 F	612 F	616 m	621 F	γC=O (amide)
-	-	587 F	591 m	γND (PCA)
550 f	550 f		535 f	squelette
		501 F	505 ep	Amide V'
492 TF	496 TF	479 ep	484 F	δC=O (PCA)
485 ep		467 ep	471 ep	
432 f	440 f			
377 TF	380 TF	373 m	377 TF	
323 m	325 TF	318 f	322 TF	Squelette
281 F	286 TF	278 m	285 F	
230 f	230 f	226 f	227 f	

TABLEAU VIII: Spectres infrarouges et Raman (1800-200 cm^{-1}) du L-pyroglutamyl-N-méthylamide et de son dérivé N-deutérié à l'état solide.

A Pro MA, la vibration NH est observée à 3236 cm^{-1} ; aussi attribuons-nous l'absorption à 3228 cm^{-1} sur le spectre de PCA - MA au vibrateur NH de la fonction amide trans. La bande à 3290 cm^{-1} correspond alors à la vibration νNH du PCA. Une telle interprétation est confirmée par la comparaison avec le spectre du DL-PCA solide, pour lequel cette vibration est observée à 3307 cm^{-1}. En effet, le vibrateur NH est légèrement moins associé dans ce dernier composé (dNH ... O = 2,963 Å) que dans PCA - MA (d=2,93 Å)

b) Vibrations de valence νC=O

Le spectre infrarouge de PCA-MA présente dans la région des vibrations de valence νC=O, trois absorptions à 1687, 1665 et 1642 cm^{-1}, cette dernière n'apparaissant qu'en épaule. La bande très fine de fréquence plus élevée est associée sans difficulté au carbonyle de la chaîne latérale (fig. 18, tableau VIII) ; sa fréquence élevée et sa faible largeur montrent qu'il s'agit d'un vibrateur libre, ce qui est en accord avec les résultats cristallographiques. Les deux autres bandes, qui subissent un léger changement par deutériation, sont dues au carbonyle du cycle. A ces deux absorptions correspond, pour les deux composés hydrogéné et deutérié, une seule raie de diffusion. La composante de plus basse fréquence est intense en diffusion et celle de plus haute fréquence en absorption. Nous relions ce phénomène à un couplage vibrationnel entre les molécules de la maille du cristal de PCA - MA. On sait en effet que l'interaction entre les vibrations des molécules contenues dans une maille peut faire éclater chaque vibration de la molécule isolée en plusieurs composantes, dont les activités infrarouge et Raman dépendent de la symétrie du cristal. La maille de PCA-MA contient deux molécules qui se déduisent l'une de l'autre par rotation autour d'un axe hélicoïdal d'ordre 2 (63). Le groupe facteur C_2 est isomorphe du groupe spatial $P2_1$. Par conséquent, chaque vibration fondamentale de PCA - MA doit éclater en deux composantes de symétries A et B actives en infrarouge et en Raman. L'absorption très intense à 1665 cm^{-1} est reliée à la composante de symétrie B ; tandis que celle à 1640 cm^{-1}, à laquelle correspond une raie de diffusion très intense, est attribuée à la composante la plus symétrique.

c) Vibrations amide II, II' et III

Les vibrations couplées amide II et III mettent en jeu les mouvements de déformation δNH et d'élongation de la liaison peptidique νC'N. Leur fréquence est donc sensible à la deutériation. L'amide II est très facilement attribuable à la bande large et intense à 1567 cm^{-1} ; cette position confirme le fait que le groupement NH est en interaction forte. L'amide III est observée à 1254 cm^{-1} (fig.18, tableau VIII). La deutériation les déplace respectivement à 1460 et 962 cm^{-1}. La bande amide II' provient essentiellement de la vibration de valence νC'N. Les travaux effectués par GRENIE (65) suggèrent qu'elle est affectée à la fois par l'association sur les groupes donneurs (NH) et accepteurs (C=0) contigüs. Les interactions du type C_5 et C_7 qui existent dans A Gly MA la déplacent d'environ 100 cm^{-1} vers les hautes fréquences par rapport à la bande libre. Etant donné que le carbonyle du groupement peptidique de PCA-MA est libre, la fréquence élevée de l'amide II' résulte uniquement de la forte association du groupe NH.

d) Vibration de déformation δNH amide cis

La deutériation nous permet d'attribuer la vibration de déformation du groupement NH de la fonction amide cis à l'absorption à 1351 cm^{-1} et la vibration δND à 1178 cm^{-1}. Cette vibration se comporte de la même façon que dans l'acide pyroglutamique (28). En effet, la substitution de l'hydrogène par le deutérium modifie les couplages des vibrations du cycle et perturbe l'allure générale du spectre entre 1200 et 800 cm^{-1} (figure 18).

e) Vibrations amide IV, V et VI

L'influence de la température et de la N-deutériation nous permet d'attribuer les deux vibrations de déformation hors du plan des groupements NH du cycle et de la chaîne latérale vers 760 et 747 cm^{-1} (figure 18). Nous désignons ces absorptions par γNH (PCA) et amide V. Les couplages auxquels elles participent expliquent la différence de leurs déplacements isotopiques. Les rapports $\frac{\gamma_{NH}}{\gamma_{ND}}$ sont égaux à 1,29 et 1,49. En ce qui concerne la bande amide V, le résultat que nous observons est en accord avec ceux obtenus par GRENIE (65) puisqu'il montre que le rapport isotopique relatif à cette vibration est d'autant plus grand que le groupement NH est plus associé. La valeur 1,29 relative au vibrateur NH du cycle est compatible avec les résultats obtenus par REYLAFON pour la pyrrolidone (62).

Les quatre vibrations δC=O et γC=O de PCA-MA sont situées à 721, 663, 611 et 492 cm^{-1}. Par comparaison avec les spectres de la pyrrolidone et de l'acide pyroglutamique, nous pouvons localiser avec certitude la vibration de déformation du groupement carbonyle du cycle à 492 cm^{-1}. Les valeurs des rapports isotopiques précédents indiquent que les vibrations γNH ne sont pas pures ; elles sont sûrement couplées avec les vibrations de déformation des carbonyles. L'influence de la deutériation nous permet de relier les bandes à 663 et 611 cm^{-1} au carbonyle de la fonction amide trans (figure 18, tableau VIII).

3 - SPECTRES DE VIBRATION DE PCA-His-ME, PCA-His-DMA et PCA-His-ProNH_2

Les spectres infrarouges de ces composés et de leurs homologues N-deutériés entre 4000 et 2000 cm^{-1} d'une part, et 1800 - 200 cm^{-1} d'autre part, sont représentés sur les figures 17, 19, 20. Les fréquences des bandes amides sont regroupées dans le tableau IX.

L'interprétation est faite par comparaison avec PCA-MA et A Pro A et par l'utilisation des corrélations entre les fréquences et les structures des amides et peptides modèles (65). La confrontation de tous ces spectres montre que l'allure générale de ceux du TRF et de PCA-His-DMA est semblable. Avant d'effectuer toute analyse vibrationnelle du TRF, on constate que ses bandes sont dans l'ensemble larges. Cette largeur nous semble provenir de deux causes : d'une part, de l'état physique de l'échantillon, d'autre part, du réseau complexe de liaisons hydrogène, que nous allons essayer d'examiner.

a) Vibration de valence νNH

Le TRF contient quatre types de groupement NH. Son spectre présente dans la région 4000-2000 cm^{-1} un massif centré à 3260 cm^{-1}, sur lequel sont vues des épaules vers 3370 et 3205 cm^{-1}, et un autre situé vers 3000 cm^{-1} (fig. 17). La comparaison avec les spectres de Z His-Pro A et A Pro A permet d'associer les absorptions à 3370 et 3205 cm^{-1} au groupement NH_2. Les deux vibrations de valence des groupements NH du cycle pyrrolidone et de la chaîne peptidique donnent lieu à l'absorption intense à 3260 cm^{-1}, mais il n'est pas exclu que l'une d'elles apparaisse à 3205 cm^{-1}. Enfin, le massif vers 3000 cm^{-1} est dû au vibrateur NH imidazolique ; sa position est fixe dans la série des composés étudiés. Le massif correspond νND (Im) est particulièrement visible à

2248 cm^{-1} sur le spectre de PCA-His-ME deutérié.

Notons que les absorptions insensibles à la deutériation correspondent aux vibrations de valence νCH.

b) Vibrations de valence νC=O

Le spectre infrarouge de PCA-His-DMA présente deux absorptions vers 1680 et 1640 cm^{-1}. Leurs largeurs nous incitent à penser qu'elles en masquent d'autres. Ceci se confirme par l'étude du spectre Raman de cet amide, sur lequel une raie est visible à 1669 cm^{-1}. Cette dernière est également observée sur le spectre de l'acétyl histidine diméthylamide. La substitution de la fonction ester du dipeptide PCA-His-ME par une fonction amide disubstituée fait apparaître une bande à 1636 cm^{-1}, qui se retrouve sur le spectre de A His DMA. Nous l'associons donc au carbonyle tertiaire (tableau IX). Par comparaison avec le spectre de ce dernier composé, nous attribuons la bande à 1669 cm^{-1} au carbonyle de la fonction amide trans, et celle vers 1680 cm^{-1} à celui de la fonction amide cis. Les spectres infrarouges du TRF et de PCA-His-DMA présentent les mêmes absorptions que nous attribuons de la même manière. Les vibrations mettant en jeu le groupement amide primaire ne sont pas localisées. Elles se superposent vraisemblablement aux deux bandes observées.

Sur le tableau IX, on constate que les positions des vibrations de valence mettant en jeu les groupements NH et CO des fonctions amide cis et trans, s'inversent entre PCA-MA et PCA-His-ME. Cette inversion lors de l'addition du résidu histidyle est vérifiée par l'abaissement des fréquences des vibrations de déformation du groupement NH peptidique (Amide II et V), et par l'élévation de celles du groupement NH amide cis (γNH, δNH). Enfin, les positions différentes de la vibration de déformation δC=O (PCA) dans PCA-MA (492 cm^{-1}) et PCA-His-ME (472 cm^{-1}) confirme que ce groupement carbonyle est beaucoup plus associé dans PCA-MA que dans l'ester. Notons que dans la pyrrolidone, cette dernière vibration a une fréquence d'autant plus élevée que l'association est renforcée (62).

c) Vibrations amide II et III

Le TRF ne possédant qu'une seule fonction amide trans, une seule bande amide II est attendue. Sa fréquence, particulièrement sensible aux associations sur le groupement NH, est fixe pour les trois composés. Il en est de même de celle de la bande amide III (tableau IX).

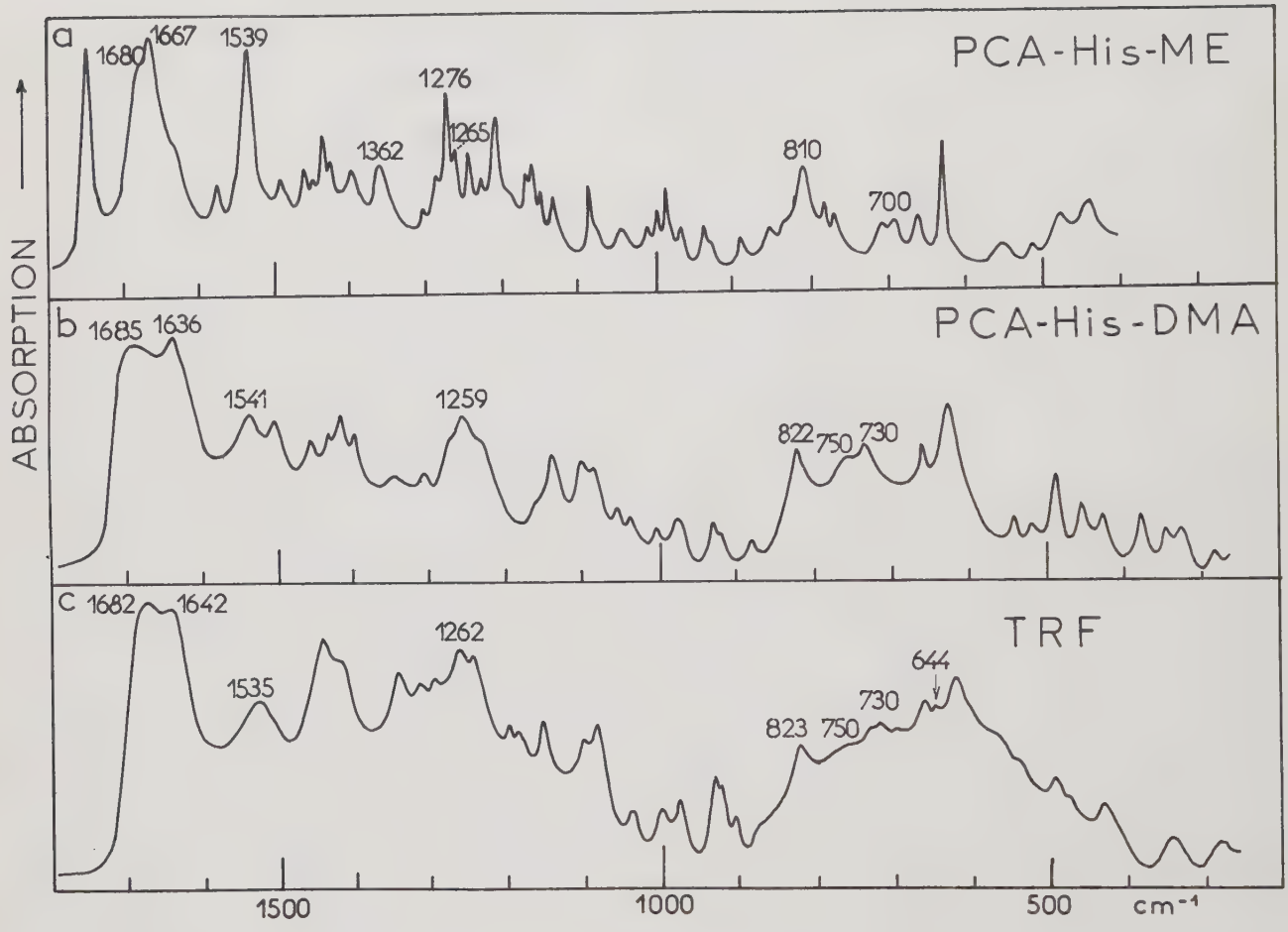


Figure 19 : Spectres infrarouges de a) PCA-His-ME, b) PCA-His-DMA, c) TRF, à l'état solide.

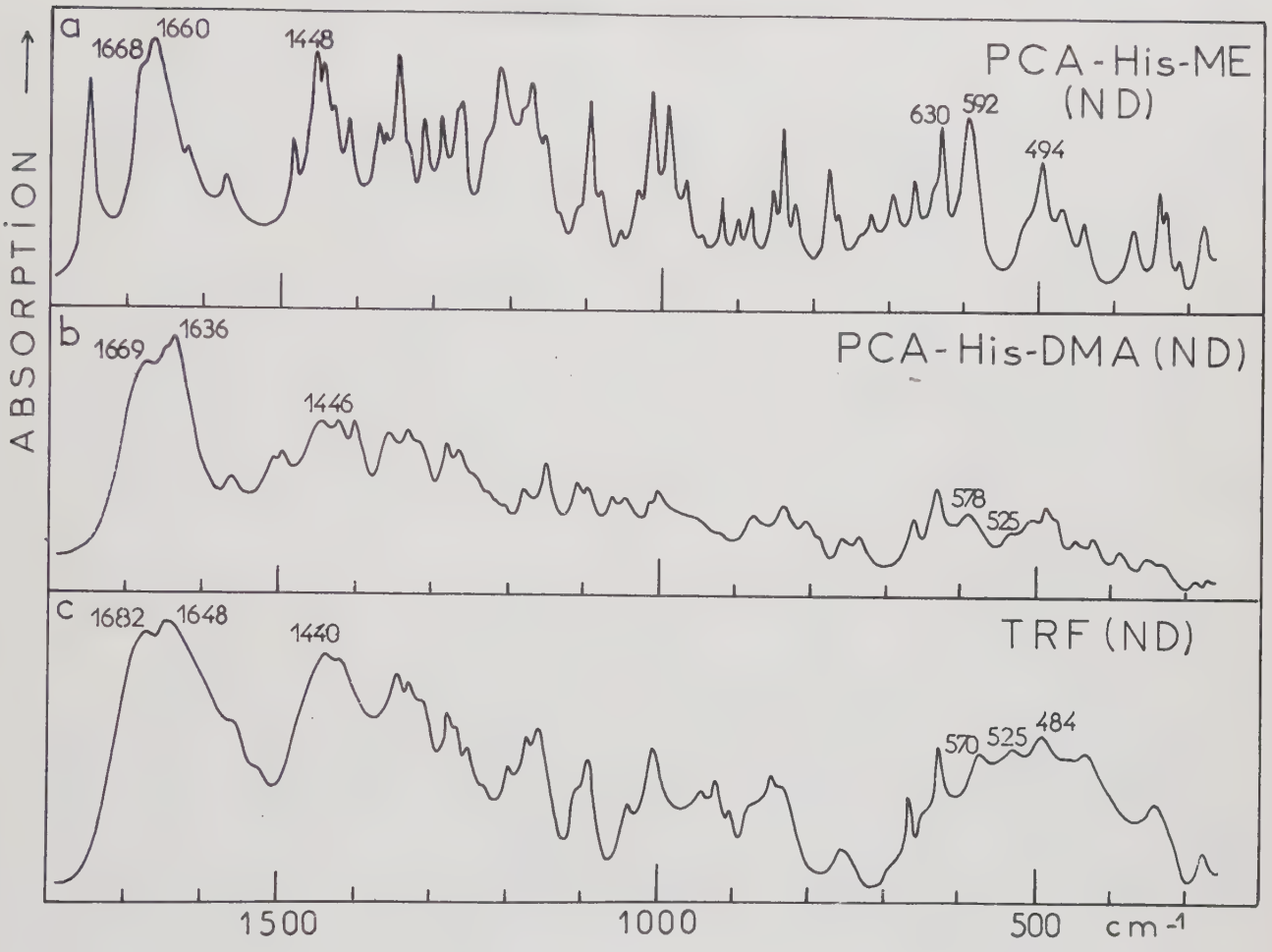


Figure 20 : Spectres infrarouges des dérivés N-deutériés de a) PCA-His-ME, b) PCA-His-DMA, c) TRF, à l'état solide.

d) Vibrations de déformation γNH.

La vibration de valence νNH imidazolique a la même fréquence sur tous les spectres des composés étudiés contenant le résidu histidyle. Cette observation suggère que leurs vibrations de déformation γNH ont des fréquences proches. A partir des corrélations établies entre les fréquences νNH et γNH de dérivés imidazoliques, (66, 67), nous attribuons cette dernière vibration à la bande relevée sur tous les spectres vers 820 cm^{-1} (tableau IX).

L'examen comparé des massifs de PCA-His-DMA et du TRF entre 800 et 400 cm^{-1} permet d'attribuer l'absorption vers 650 cm^{-1} à la vibration de balancement ωNH_2 du TRF. Les deux autres vibrations de déformation γNH sont plus difficiles à localiser. Elles sont responsables de la forte intensité des bandes vers 750 et 730 cm^{-1}. Les bandes correspondantes sur les spectres des produits deutériés sont facilement identifiées vers 570 et 525 cm^{-1} car elles apparaissent dans un domaine moins riche en absorption. L'attribution du spectre de PCA-MA permet de relier la bande de plus haute fréquence au groupement NH de la fonction amide cis, et l'autre à la vibration amide V' (tableau IX).

e) Discussion

Il ressort de cette interprétation que tous les groupements NH ou C=O du TRF sont engagés dans des liaisons hydrogène. Les bandes amide II, γNH (Im) et ωNH_2, sensibles à ce type d'interaction ont été attribuées sans ambiguïté. Leurs positions montrent que dans le TRF les vibrateurs correspondants sont moins associés que dans les molécules modèles : PCA-MA, A Pro A ou l'imidazole. En outre, les fréquences relativement élevées des vibrations de valence νC=O suggèrent que chacun des carbonyles ne participe qu'à une seule liaison hydrogène.

Nous avons essayé de rapprocher la fréquence νC=O du carbonyle amide cis de celles des complexes 1/1 et 1/2 du N-méthylpyrrolidone avec le butanol en solution dans l'hexane (68). Dans PCA-MA, ce carbonyle forme deux liaisons hydrogène et la fréquence de sa vibration de valence est très proche de celle du complexe 1/2. Par contre, la fréquence observée sur le spectre du TRF est voisine de celle du complexe 1/1.

De même la position de la vibration de valence du carbonyle tertiaire est proche de celle du complexe 1/1 du N-N-diméthylacétamide avec le méthanol (69).

	Z-His-Pro A	AProA	A-His-DMA	PCA-MA	PCA-His-ME	PCA-His-DMA	PCA-His-Pro A
Amide A							
νNH (PCA)	3270		3250	3228	3307	3250	3260
				3290	3200	3250	3260
νNH (Im)*	∿ 3000				∿ 3000	∿ 3000	∿3000
νNH_2	[3380	[3357					[3370
	[3205	[3170					[3210
Amide I			1665	1687	1667	1669	
νC=O (PCA)				1665	1680	1685	1682
νC=O (Pro)		1696					
νC=O (tertiaire)	1640		1635			1636	1642
Amide II	1525		1540	1566	1539	1541	1535
Amide II'				1460	1448	1446	
δNH (PCA)				1351	1362		
Amide III				1254	1265	1259	1262
Amide V			∿750	747	700	750	∿750
γNH PCA				758	810	730	∿730
γNH Im	825		∿820		810	820	823
ωNH_2	620	678					644
Amide V'				501	494	∿520	525
γND (PCA)				587	592	578	570
γND (Im)					630		
ωND_2		514					484

TABLEAU IX : Attribution des bandes d'absorption infrarouges dues à quelques vibrations des groupements C=O, N-H et C'-N.

* Fréquence évaluée à 50 cm^{-1} près.

- Chapitre II -

INTERPRETATION DU SPECTRE RAMAN ET ETUDE CONFORMATIONNELLE DU TRF EN SOLUTION AQUEUSE

La diffusion Raman fournit les mêmes informations que l'absorption infrarouge, à savoir les énergies de vibration. La première méthode présente un avantage sur la seconde ; en effet, elle permet l'analyse de solutions aqueuses, puisque le spectre de diffusion de l'eau ne présente que très peu de bandes. Grâce à cette possibilité et au développement de la spectroscopie Raman par l'utilisation des lasers, cette technique a été particulièrement exploitée depuis quelques années pour étudier les molécules biologiques (70, 71, 72).

Certaines vibrations sont plus facilement identifiées par une technique que par l'autre. Ainsi, les vibrations de squelette, faibles en absorption, apparaissent comme étant les plus intenses sur les spectres de diffusion. Afin de compléter l'analyse vibrationnelle du TRF effectuée par spectroscopie infrarouge, nous avons examiné les spectres Raman de l'hormone et des composés modèles en solution aqueuse (fig. 21, 22, 23). Le principal but de cette étude est de déterminer l'état de solvatation des groupements carbonyles par l'eau.

1 - ATTRIBUTION DU SPECTRE RAMAN DU TRF

Le spectre Raman du TRF présente plusieurs raies intenses caractéristiques des acides aminés constituant la molécule. Leur identification est faite à l'aide du spectre du mélange de PCA, His et Pro en quantité équimolaire (fig. 21). La comparaison de ces deux spectres met en évidence non seulement les vibrations des noyaux, mais aussi celles des liaisons peptidiques et du nouveau squelette formés par l'accrochage des résidus.

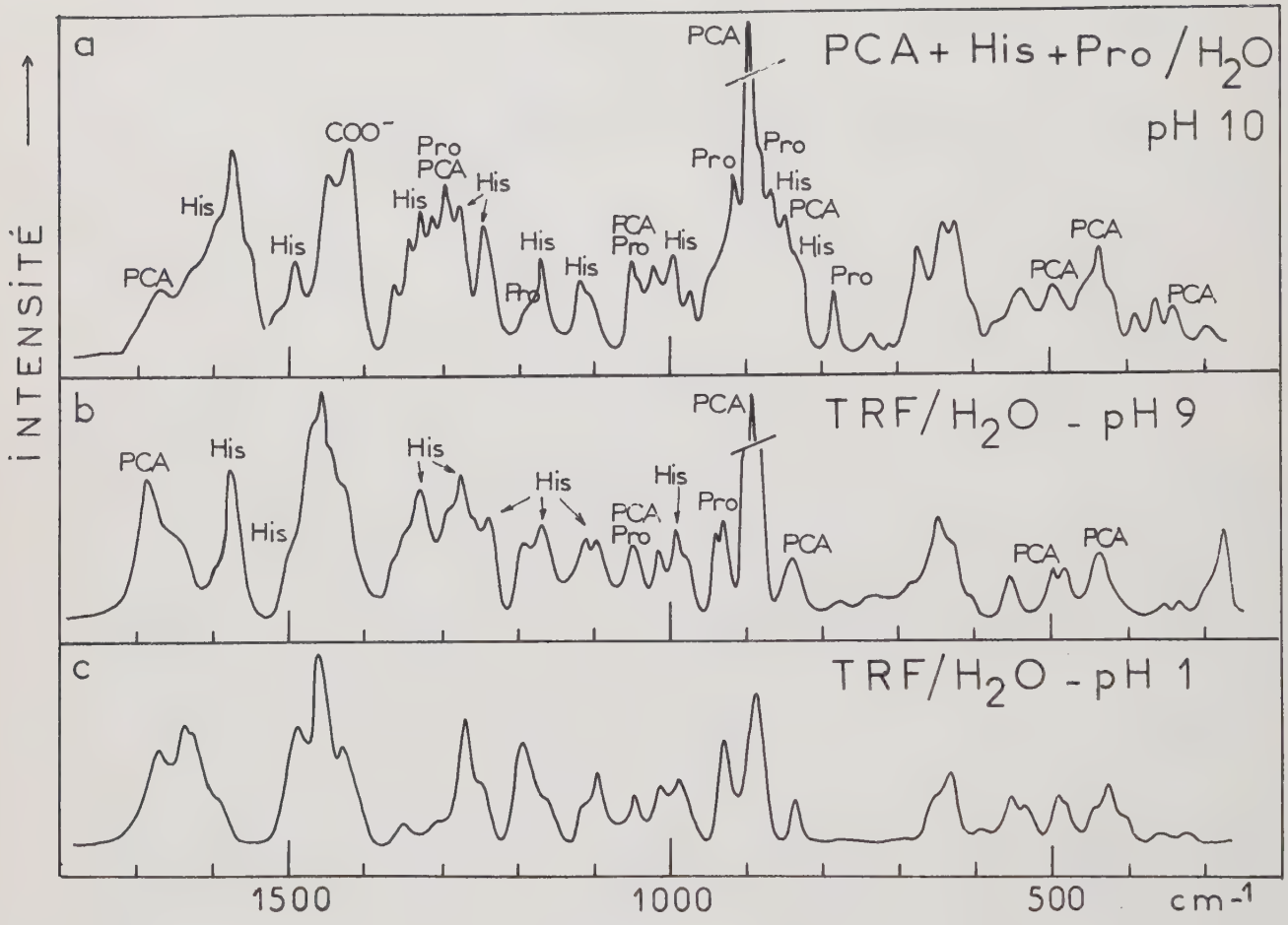


Figure 21 : Spectres Raman des solutions aqueuses a) du mélange des acides aminés PCA, His, Pro (pH 10), b) du TRF (pH 9) c) du TRF (pH 1).

a) Vibrations caractéristiques des cycles

La chaîne latérale de l'histidine, à cause de son caractère aromatique, donne naissance à des raies Raman très intenses. Elles se trouvent sur le spectre du TRF à 1573, 1492, 1315, 1270, 1235, 1164 et 988 cm^{-1} (fig. 21). Ces vibrations dues au cycle imidazolique sont peu influencées par la proximité des deux autres résidus ; leurs fréquences sont en effet très proches de celles relevées sur le spectre de l'histidine lui-même (66). La vibration de déformation δNH dans le plan du cycle imidazolique se trouve dans le massif situé à 1164 cm^{-1} ; en effet, ce dernier est affecté à la fois par la protonation et la deutériation sur le cycle. Les comportements de ces vibrations et de celles de la molécule d'histidine sont identiques, la deutériation les déplace de la même façon.

A pH = 1 des raies intenses, caractéristiques du cycle imidazolium, sont relevées à 1634, 1267, 1191 et 630 cm^{-1} (fig. 21). La sensibilité de ces fréquences avec le pH, déjà mise en évidence par étude de la protonation de l'imidazole et de l'histidine (66), est tout à fait compréhensible puisqu'elle traduit les variations de densité électronique des liaisons provoquées par la protonation. Ainsi, ces raies permettent de préciser l'état d'ionisation de la chaîne latérale de l'histidine dans le TRF. Il est probable qu'elles se montreront également très utiles lors de l'étude de la complexation des ions métalliques avec le TRF.

La raie la plus intense du spectre du TRF, à 888 cm^{-1}, est due à la vibration de respiration du cycle pyrrolidone. Quelques autres vibrations de ce cycle et du noyau pyrrolidine apparaissent peu intenses ; leurs fréquences, au contraire de celles du résidu histidyle, varient peu avec le pH.

b) Vibrations caractéristiques des groupements peptidiques

Le spectre Raman du TRF présente dans la région 1700 - 1600 cm^{-1} deux raies intenses à 1677 et 1640 cm^{-1} ; celle de plus haute fréquence est accompagnée d'une épaule vers 1660 cm^{-1}. Ces trois bandes sont attribuées aux vibrations de valence νC=0 des différents carbonyles peptidiques et amides (tableau X). L'analyse des spectres Raman de PCA et PCA-MA (28) (fig. 22 et 23) conduit à attribuer les deux bandes de fréquence élevée respectivement aux vibrations de valence des carbonyles des fonctions amide cis et amide trans. En solution dans D_2O, leurs fréquences diminuent d'environ 15 cm^{-1} par rapport à la solution H_2O, en particulier, le carbonyle amide cis est vu

à 1663 cm^{-1} sur le spectre du TRF deutérié. Il est vraisemblable que la bande de plus haute fréquence correspond également à la vibration νC=O de la fonction amide primaire. En effet, elle est observée à 1677 cm^{-1} sur le spectre de A Pro A (fig. 22) ; par deutériation, son couplage important, que nous avons mis en évidence à l'état solide avec la vibration δNH_2, est supprimé, ce qui la déplace à 1650 cm^{-1}. La bande correspondante sur le spectre du TRF deutérié se superpose donc à celle à 1640 cm^{-1} due aux carbonyles secondaire et tertiaire. La bande de plus basse fréquence sur le spectre du TRF provient du carbonyle tertiaire. Notons que cette interprétation est confirmée par celle de PCA-His-DMA, mais que sur le spectre de ce dernier composé, le carbonyle tertiaire apparaît à une fréquence plus basse (1626 cm^{-1}) que sur celui du TRF.

Une deuxième bande caractéristique de la liaison CO-NH est relevée vers 1275 cm^{-1} sur le spectre Raman du TRF. Elle provient de la vibration amide III. On la retrouve à la même position sur les spectres des composés modèles.

Une autre bande est particulièrement visible sur les spectres Raman, c'est celle correspondant à la vibration νC'N (tableau XI). La comparaison des spectres Raman du TRF et de A Pro A nous permet de situer la vibration νCN de la fonction amide primaire à 1429 cm^{-1}. La deutériation la déplace sur les spectres de A Pro A et du TRF à 1440 cm^{-1}. La bande à 1445 cm^{-1} du TRF est associée à la vibration d'élongation νCN de la liaison peptidique entre les résidus histidyle et prolyle. Enfin, la vibration amide II' (tableau VI) est localisée à 1480 cm^{-1} par confrontation des spectres du TRF et de son homologue deutérié.

2 - DISCUSSION

Quelques informations concernant la structure de l'hormone en solution aqueuse peuvent être dégagées de l'analyse que nous venons d'effectuer. A priori, de par leurs positions dans la molécule, on peut penser que les quatre carbonyles du TRF ne sont certainement pas solvatés de la même façon. L'analyse des composés modèles permet de situer les différents types de vibrateurs C=O entièrement solvatés. Nous nous sommes servis de ces fréquences pour déterminer l'état de solvatation des carbonyles correspondants dans la molécule de TRF. L'examen du tableau X suggère que les groupements C=O des fonctions amide cis, amide trans et amide primaire sont en contact avec l'eau

	Amide cis	Amide primaire	Amide I	Amide tertiaire
DMA - D_2O 1/1 (73)				(1632)*
DMA - D_2O 1/2 (73)				(1609)
A - Sar - EA			(1645)	(1619)
A - Pro - A		1677 (1650)		1615 (1610)
PCA - MA	1675 (1664)		1657 (1636)	
PCA - His - DMA	1673 (1668)		1658 (1645)	1626 (1626)
TRF	1677 (1663)	1677 (1640)	1660 (1640)	1640 (1640)

TABLEAU X : Fréquences des vibrations de valence des carbonyles des différentes fonctions amide de composés en solution aqueuse.

* Les fréquences entre parenthèses sont relatives aux composés en solution dans D_2O

	Amide primaire	Amide II'	Amide tertiaire
$CH_3 - CONH_2$[1] (58)	1404 (1427)[2]		
A - Gly - MA (75)		(1488)	
A - Pro - A	1430 (1440)		1475 (1475)
PCA - MA		(1492)	
PCA - His - DMA		(1482)	1450 (1450)
TRF	1429 (1440)	(1480)	1445 (1440)

TABLEAU XI : Fréquences des vibrations de valence νCN des différentes fonctions amide de composés en solution aqueuse.

1 : Fréquences relevées à l'état solide

2 : Les fréquences entre parenthèses sont relatives aux composés N-deutériés.

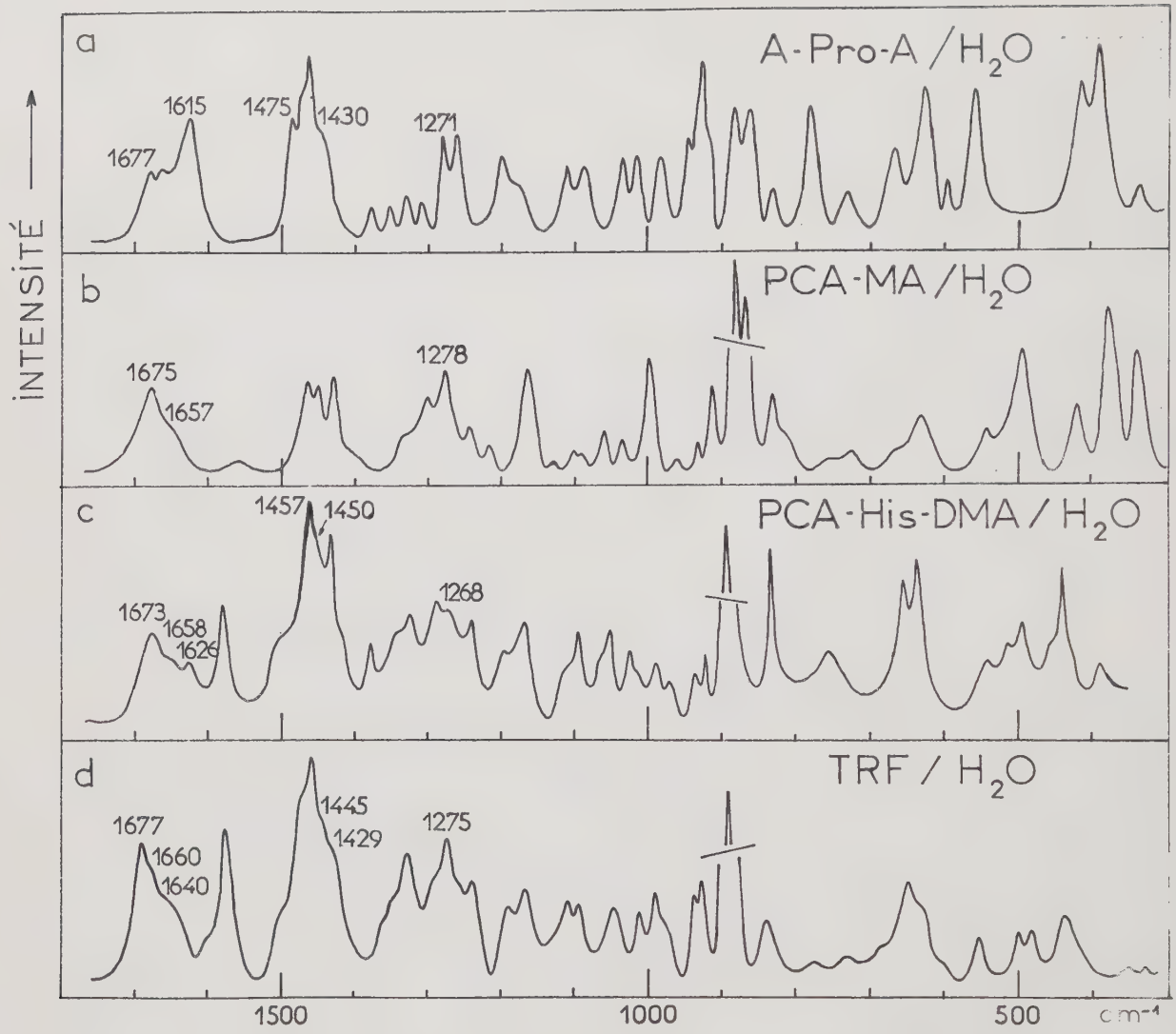


Figure 22 : Spectres Raman de a) A Pro A, b) PCA-MA, c) PCA-His-DMA, d) TRF, en solution aqueuse (H_2O).

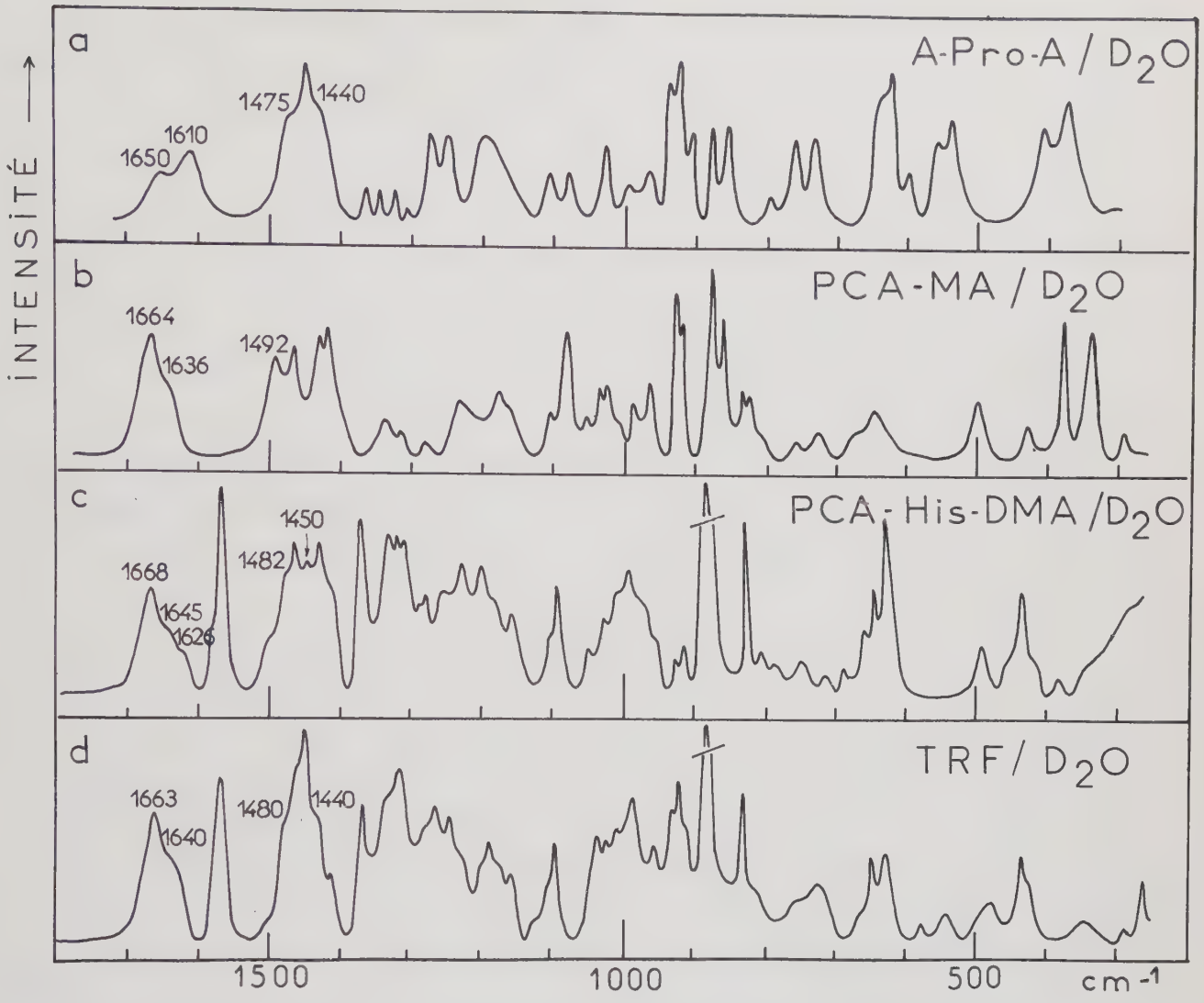


Figure 23 : Spectres Raman des dérivés N-deutériés : a) A Pro A, b) PCA-MA, c) PCA-His-DMA, d) TRF, en solution aqueuse (D_2O).

de la même façon que dans les petites molécules, telles que PCA-MA ou A Pro A. Par contre, il semble que le carbonyle de la fonction amide tertiaire est peu exposé au milieu aqueux et qu'il est protégé par les cycles volumineux. L'étude des solutions de DMA permet de suivre l'évolution de la fréquence νC=O en fonction de l'hydratation progressive de la molécule. Le complexe 1/1 est caractérisé par une bande à 1632 cm^{-1} (73) (tableau X). Les fréquences particulièrement basses observées sur les spectres de l'acétyl-sarcosine N-éthylamide (A Sar EA) et A Pro A montrent que ce groupement carbonyle est entièrement solvaté. Par contre, la fréquence observée sur le spectre de PCA-His-DMA indique que dans ce composé, le carbonyle tertiaire ne forme qu'une seule liaison hydrogène avec l'eau. Enfin, la fréquence encore plus élevée sur le spectre du TRF suggère que ce carbonyle est protégé dans l'hormone.

D'autre part, l'étude infrarouge du N-méthyl-acétamide en solution dans divers solvants a montré que la fréquence du mode complexe amide III augmente par association sur le NH (74). Sa position élevée sur le spectre du TRF (1275 cm^{-1}) suggère que le groupement NH peptidique du résidu histidyle est hydraté.

Des travaux récents sur le DMA indiquent que l'association sur la liaison C=O provoque une augmentation importante de la fréquence νCN (73). L'étude de peptides modèles en matrice est en accord avec ce résultat (65) et montre qu'en outre dans les amides trans, cette fréquence est également affectée par la chélation sur le NH. La fréquence de l'amide II' du TRF (1480 cm^{-1}) confirme les conclusions tirées des positions des bandes amide I et III, à savoir que les groupements C=O et NH sont solvatés. Enfin, la fréquence relativement peu élevée de la vibration νCN amide tertiaire vérifie que le carbonyle du résidu histidyle est protégé.

Etant donné la grande complexité du spectre du TRF, il ne nous a pas été possible d'examiner le tautomérisme prototropique particulier aux dérivés de l'imidazole substitué en position 4 ou 5. Certaines raies dues aux vibrations du noyau sont doubles et ce dédoublement pourrait résulter de l'équilibre entre les deux formes tautomères ; cependant, la faible intensité de l'une des composantes de la vibration de noyau à 1573 cm^{-1} indique une prédominance de l'une des formes, sans qu'il nous soit possible de préciser laquelle.

CONCLUSION

L'objectif essentiel de ce travail a été l'étude conformationnelle expérimentale d'une hormone hypothalamique, de nature peptidique, le TRF.

Avant d'exposer nos résultats expérimentaux, nous avons analysé d'une manière simple le fonctionnement du système hypothalamo-hypophysaire, et plus précisément, le rôle joué par la neurosécrétion de l'hypothalamus dans la régulation thyroïdienne. Nous avons, en outre, examiné les premiers résultats relatifs à des analogues du TRF synthétisés dans le but de prévoir le site actif de cette hormone et de tester l'influence de sa structure sur son activité biologique.

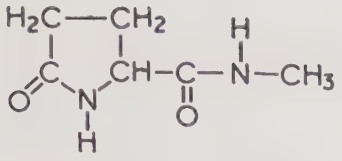
L'étude des propriétés physico-chimiques des dérivés peptidiques en solution aqueuse, constitue une autre approche de la structure géométrique de ces dérivés et de leur mécanisme d'action. Nous avons abordé l'analyse conformationnelle du TRF par résonance magnétique nucléaire et spectroscopie de vibration. Nous avons proposé une attribution détaillée du spectre RMN de l'hormone et de la plupart de ses vibrations fondamentales mettant en jeu les groupements peptidiques. Celle-ci a pu être faite grâce à l'examen comparé des spectres de nombreux composés modèles qui représentent des fragments de la molécule de TRF.

De l'interprétation des spectres de résonance magnétique nucléaire se dégagent quelques informations structurales concernant la molécule de TRF en solution. En particulier, nous avons montré que la liaison peptidique entre les deux résidus histidyle et prolyle adopte la configuration trans. D'autre part, nous avons mis en évidence que les cycles pyrrolidine et pyrrolidone sont rigides et que ce dernier est moins déformé que celui de l'acide pyroglutamique. En outre, il apparaît que le résidu pyroglutamyle est en faible interaction avec les autres. Les constantes de couplage mettant en jeu le proton $C_\alpha H$ His, nous ont permis de discuter de l'orientation du cycle imidazolique par rapport au squelette peptidique. Enfin, la constante de couplage J_{NH-CH} entre les

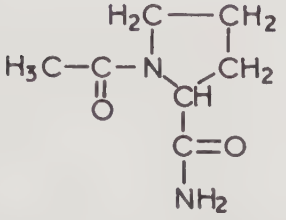
protons vicinaux du résidu histidyle nous a conduit, à l'aide d'une fonction de KARPLUS modifiée à trois valeurs possibles du paramètre ϕ définissant la conformation de ce squelette. Un calcul effectué au Centre de Recherches Paul Pascal nous a permis de sélectionner la géométrie correspondant à $\phi = -150°$ comme étant la plus probable, les deux autres valeurs conduisant à des structures stériquement défavorisées.

D'autres renseignements sur la molécule en solution aqueuse ont pu être obtenus par l'analyse du spectre Raman du TRF. Notamment, nous avons montré que tous les carbonyles sont en contact avec le solvant, à l'exception de celui du résidu histidyle qui semble protégé. Par contre, le groupement NH de ce même résidu est en interaction avec l'eau. L'attribution des vibrations de valence νCN du TRF N-deutérié vérifie l'ensemble de ces conclusions.

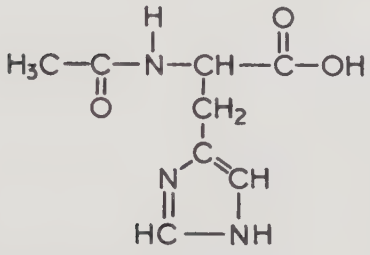
Enfin, nous avons montré par spectroscopie infrarouge qu'un réseau complexe de liaisons hydrogène moyennement fortes assure la stabilité du TRF à l'état solide, et que tous les groupements C=O et N-H sont perturbés. Ces résultats ont été obtenus par comparaison avec les spectres d'absorption des deux composés modèles dont les structures cristallines sont connues (A Pro MA et PCA-MA). Toutefois, des renseignements cristallographiques concernant d'autres composés intermédiaires auraient été nécessaires pour nous permettre de préciser les interactions mises en jeu.



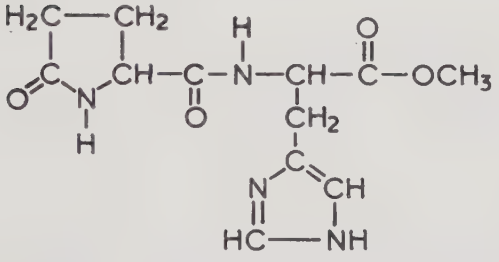
L - pyroglutamyl - méthylamide (PCA - MA)



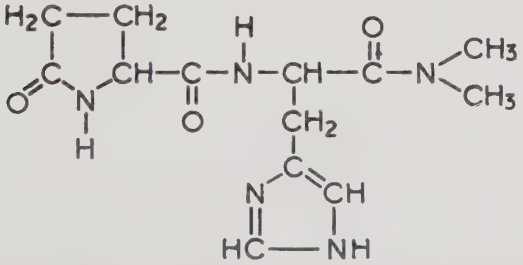
acétyl - L - prolinamide (A - Pro - A)



acétyl - L - histidine (A - His)



L - pyroglutamyl - L - histidyl - méthylester (PCA - His - ME)



L - pyroglutamyl - L - histidyl - diméthylamide (PCA - His - DMA)

Figure 24 : Formules développées et abréviations des différents composés modèles étudiés.

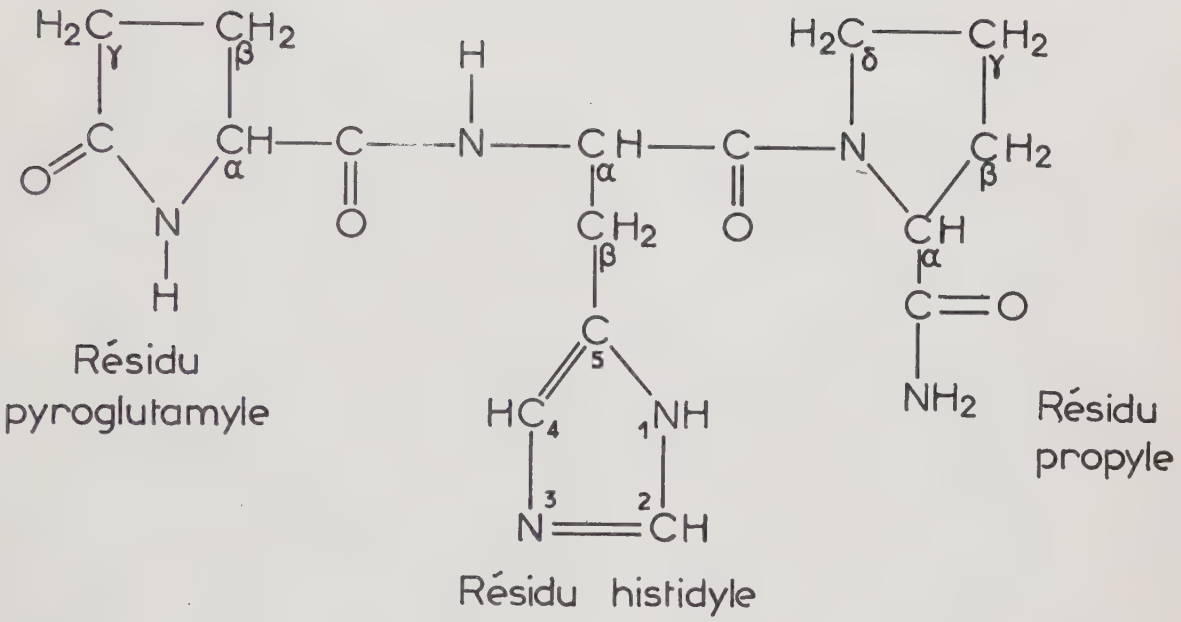


Figure 25 : Structure primaire du TRF.

APPENDICE

CONDITIONS EXPERIMENTALES

I - COMPOSES

Le dérivé Z-His-Pro-A provient de Cyclo Chemical Corporation. Les composés A Pro A, PCA-MA, PCA-His-ME, PCA-His-DMA et le TRF nous ont été donnés par Dr R.O. STUDER de la société Hoffmann.La Roche de Bâle. Un échantillon de PCA-MA nous a été également fourni par Monsieur MARRAUD du laboratoire du Professeur NEEL à Nancy.

Les analogues N-deutériés de tous ces composés ont été obtenus par échange rapide avec D_2O. L'eau a été évaporée et les produits séchés sous vide. Le taux d'échange NH/ND est d'environ 95 %.

Le TRF synthétisé au C.R.P.P. par Mesdames DUPART et DUBIEN a été préparé selon la méthode de CHANG et coll. (13).

II - SPECTRES

Les spectres infrarouges ont été enregistrés avec un spectromètre Perkin-Elmer, modèle 225. Les solides ont été examinés en suspension dans le fluorolube et le nujol.

Les spectres Raman ont été obtenus avec un appareil Coderg P.H.1. La raie excitatrice était celle à 6328 $\mathring{A}$ d'un laser à gaz hélium-néon. Le volume des cuves était de 0,3 ou 1 cm^3 et les concentrations de 1 Ml^{-1}.

BIBLIOGRAPHIE

(1) R. GUILLEMIN, E. SAKIZ et D.N. WARD - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118 1132 (1965).

(2) A.V. SCHALLY, C.Y. BOWERS, T.W. REDDING et J.F. BARRETT - Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 165 (1966).

(3) R. BURGUS, T.F. DUNN, D. DESIDERIO et R. GUILLEMIN - C.R. Acad. Sci. série D, 269, 1870 (1969).

(4) J.BOLER, F. ENZMANN, K. FOLKERS, C.Y. BOWERS et A.V. SCHALLY - Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 705 (1969).

(5) C.Y. BOWERS, A.V. SCHALLY, W.D. HAWLEY, C. GUAL et A. PARLOW - J. clin endocrinology and metabolism, 28, 978 (1968).

(6) G. MILHAUD, P. RIVAILLE, M.S. MOUKHTAR, J.C. JOB et E. BINET - C.R. Acad. Sci., série D, 271, 1900 (1970).

(7) H. MATSUO, Y. BABA, R.M.G. NAIR, A. ARIMURA et A.V. SCHALLY - Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1334 (1971).

(8) A.V. SCHALLY, Y. BABA, R.M.G. NAIR et C.D. BENNETT - J. Biol. Chem., 246, 6647 (1971).

(9) M. JUTISZ - Conférence Orléans, physicochimie et biologie des petits dipeptides (1971).

(10) D. GILLESSEN, A.M. FELIX, W. LERGIER et R.O. STUDER - Helv. Chim. Acta, 53, 63 (1970)

(11) D. GILLESSEN, F. PIVA, H. STEINER et R.O. STUDER - Helv. Chim. Acta, 54, 1335 (1971).

(12) C. BOWERS, A. WEIL, J.K. CHANG, H. SIEVERTSSON, F. ENZMANN et K. FOLKERS - Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 683 (1970).

(13) J.K. CHANG, H. SIEVERTSSON, B. CURIE, K. FOLKERS et C. BOWERS - J. Med. Chem., 14, 484 (1971).

(14) K. HOFFMAN et C. BOWERS - J. Med. Chem. 13, 1099 (1970).

(15) H. SIEVERTSSON, J.K. CHANG, K. FOLKERS et C. BOWERS - J. Med. Chem., 15 219 (1972).

(16) W. VALE, J. RIVIER et R. BURGUS - Endocrinology, 89, 1485 (1971).

(17) R.M.G. NAIR, T.W. REDDING et A.V. SCHALLY - Biochemistry, 10, 3621 (1971).

(18) W. VALE, R. BURGUS, T.F. DUNN et R. GUILLEMIN - Hormones, 2, 193 (1971).

(19) R. BURGUS, T.F. DUNN, D.M. DESIDERIO, D.N. WARD, W. VALE, R. GUILLEMIN, A.M. FELIX, D. GILLESSEN et R.O. STUDER - Endocrinology, 86, 573 (1970).

(20) C.Y. BOWERS, A.V. SCHALLY, F. ENZMANN, J. BOLER et K. FOLKERS - Endocrinology, 86, 1143 (1970).

(21) J. FEENEY, G.C.K. ROBERTS, J.H. ROCKEY et A.S.V. BURGEN - Nature New Biology, 232, 108 (1971).

(22) P.H. VON DREELE, A.I. BREWSTER, F.A. BOVEY, H.A. SCHERAGA, M.F. FERGER et V. du VIGNEAUD - Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 3088 (1971).

(23) P. de SANTIS et A.M. LIQUORI - Biopolymers, 10, 699 (1971).

(24) C.M. DEBER, F.A. BOVEY, J.P. CARVER et E.R. BLOUT - J. Amer. Chem. Soc. 92, 6191 (1970).

(25) D.A. TORCHIA et F.A. BOVEY - Macromolecules, 4, 246 (1971).

(26) V.F. BRYSTOV, S.L. PORTNOVA, V.I. TSETLIN, V.T. IVANOV et Y.A. OVCHINNIKOV - Tetrahedron, 25, 493 (1969).

(27) G.C.K. ROBERTS et O. JARDETZKY - Advances in Protein Chem., 24, 447 (1970).

(28) M. VITORES - Thèse Bordeaux (1972).

(29) J.C. BOILOT - Travaux en cours.

(30) F.A.L. ANET et A.J.R. BOURN - J. Amer. Chem. Soc., 87, 5250 (1965).

(31) W.E. STEWART et T.H. SIDDALL - III, Chem. Rev., 70, 517 (1970).

(32) L.F. JOHNSON, I.L. SCHWARTZ et R. WALTER - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64 1269 (1969).

(33) J. BELLE, M. MONTAGUT et A.M. BELLOCQ - Publication en cours.

(34) G. FLOURET - J. Med. Chem., 13, 843 (1970).

(35) V. PATTABHI et K. VENKATESAN - Cryst. Struct. Comm., 1, 87 (1972).

(36) A. AUBRY, M. MARRAUD, J. PROTAS et J. NEEL - C.R. Acad. Sci. 274 C, 1378 (1972).

(37) A.A. BOTHNER-BY, in Adv. Mag. Res., Ed. WAUGH, Acad. Press New-York - London, 1, 33 (1965).

(38) V. MADISON et J. SCHELLMAN - Biopolymers, 9, 511 (1970).

(39) D.W. URRY et R. WALTER - Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 956 (1971).

(40) J.T. JERIG - Biopolymers 10, 2435 (1971).

(41) "Peptides et acides aminés" - K.D. KOPPLE, Ediscience, Paris (1968).

(42) B. WEINSTEIN et A.E. PRITCHARD - J. Chem. Soc., Perkin I, 1015 (1972).

(43) R.J. ABRAHAM et K.A. Mc LAUCHLAN - Mol. Phys., 5, 513 (1962).

(44) R.B. MARTIN et R. MATHUR - J. Amer. Chem. Soc., 87, 1065 (1965).

(45) T.J. KISTENMACHER et R.E. MARSH - Science, 172, 946 (1971).

(46) K.R.G. PACHLER - Spectrochimica Acta, 19, 2085 (1963) ; 20, 581 (1964).

(47) K.D. KOPPLE - Biopolymers, 10, 1139 (1971).

(48) IUPAC-IUB - Commission OM Biochemical Nomenclature, Biochemistry, 9, 3471 (1970).

(49) G.N. RAMACHANDRAN et R. CHANDRASEKARAN - Biopolymers, 10, 2113 (1971).

(50) C.C. Mc DONALD et W.D. PHILLIPS - J. Amer. Chem. Soc., 85, 3736 (1963).

(51) H. SIGEL et D.B. Mc CORMICK - J. Amer. Chem. Soc., 93, 2041 (1971).

(52) R.M. BADGER et A.D.E. PULLIN - J. Chem. Phys., 22, 1142 (1954).

(53) T. MIYAZAWA, T. SHIMANOUCHI et S.I. MIZUSHIMA - J. Chem. Phys., 24, 408 (1956).

(54) T. MIYAZAWA - Bull. Chem. Soc. Japan, 34, 691 (1961).

(55) M. REY-LAFON, M.T. FOREL et C. GARRIGOU-LAGRANGE - Spectrochim. Acta, sous presse.

(56) T. MIYAZAWA, dans "Poly- αamino Acids" (G.D. FASMAN ed.) M. DEKKER, Inc. New-York (1967).

(57) Y. KOYAMA et T. SHIMANOUCHI - Biopolymers, 6, 1037 (1968).

(58) I. SUZUKI - Bull. Chem. Soc. Japan, 35, 1279 (1962).

(59) T. UNO, K. MACHIDA et Y. SAITO - Bull. Chem. Soc. Japan, 42, 897 (1969).

(60) T. MATSUZAKI et Y. IITAKA - Acta Cryst., B 27, 507 (1971).

(61) A.W. HERLINGER et T.V. LONG - J. Amer. Chem. Soc., 92, 6481 (1970).

(62) M. REY-LAFON, M.T. FOREL et J. LASCOMBE - J. Chem. Phys., 64, 1435 (1967).

(63) A. AUBRY, M. MARRAUD, J. PROTAS et J. NEEL - C.R. Acad. Sci. Paris, 274 C, 1378 (1972).

(64) V. PATTABHI et K. VENKATESAN - Cryst. Struct. Comm., 1, 87 (1972).

(65) Y. GRENIE - Thèse Bordeaux (1972) n° C.N.R.S. A.O. 5464.

(66) A.M. BELLOCQ - Thèse Bordeaux (1969) n° C.N.R.S. A.O. 2918.

(67) C. PERCHARD - Thèse Paris (1968) n° C.N.R.S. A.O. 1870.

(68) P. COMBELAS - Thèse 3ème cycle, Bordeaux (1966).

(69) M.H. BARON, J. de VILLEPIN, C. QUIVORON et M.L. JOSIEN - J. Chem. Phys., 67, 1759 (1970).

(70) R.C. LORD et N.T. YU - J. Mol. Biol. 50, 509 (1970).

(71) G.T.THOMAS, Jr. - Biochim. Biophys. Acta, 213, 417 (1970).

(72) A.M. BELLOCQ, R.C. LORD et R. MENDELSOHN - Biochim. Biophys. Acta, 257, 280 (1972).

(73) C. de LOZE, P. COMBELAS, P. BACELON, C. GARRIGOU-LAGRANGE - J. Chim. Phys., 69, 397 (1972).

(74) M. REY-LAFON, J. LASCOMBE et M.L. JOSIEN, Ann. Chim., 8, 493 (1963).

(75) M. AVIGNON - Thèse Bordeaux (1972) n° C.N.R.S. A.O. 5480.

Vu et approuvé
Bordeaux, le
Le président de l'Université
de Bordeaux I

Imprimerie du C.R.P.P.
33 - TALENCE
- 1972 -